

ANNALES DE L'INSTITUT PASTEUR

SUR LE TITRAGE (STANDARDISATION) DES TUBERCULINES

par A. CALMETTE et DE POTTER

Lors de sa réunion d'octobre 1924, le Comité d'Hygiène de la Société des Nations a décidé d'instituer, sous la présidence du D^r Tsurumi, une Commission dans le but :

1^o D'étudier les méthodes mises en pratique dans les divers laboratoires pour mesurer l'activité des tuberculines ;

2^o De comparer les résultats qu'elles fournissent ;

3^o D'établir si, en l'état actuel de nos connaissances, il est possible de recommander le choix de l'une d'elles comme méthode de *standardisation* ou de *titrage*.

Pour lui permettre de remplir sa tâche, cette Commission nous a priés d'entreprendre les expériences que nous estimions utiles et de lui en faire connaître les conclusions. C'est l'objet essentiel du présent travail.

Il était entendu que nous devions limiter notre enquête et nos recherches à la *vieille tuberculine* (O. T.) ou *tuberculine brute de Robert Koch*.

Nous avons tout d'abord rédigé un questionnaire dont on trouvera ci-après le texte (*Annexe A.*) et que la Section d'Hygiène de la Société des Nations s'est chargée d'adresser aux laboratoires officiellement connus comme préparant des

tuberculines pour l'usage vétérinaire (*Annexe B.*). Leurs obligeantes réponses nous ont été aussitôt transmises et nous commencerons par en résumer brièvement la substance.

A. — Préparation de la tuberculine (O. T.).

1° RACES DE BACILLES UTILISÉS. — Ce choix a une grande importance, car l'activité d'une tuberculine dépend en partie de l'origine des souches microbiennes employées et, bien que la fonction tuberculinique ne soit pas toujours en rapport étroit avec la virulence, il semble que les bacilles avirulents ou peu virulents soient de médiocres producteurs de tuberculine.

La plupart des Instituts utilisent des mélanges de cultures de bacilles bovins et de bacilles humains. Toutefois, ceux qui ne préparent que des tuberculines destinées à la médecine vétérinaire se servent exclusivement de bacilles bovins, et quelques autres préparent, en partant de souches de tuberculose humaine, des tuberculines réservées à l'usage humain.

Les cultures aviaires sont habituellement écartées, sauf pour l'obtention de tuberculines *aviaires* ou *mixtes* qui servent à déceler la tuberculose aviaire chez les oiseaux de basse-cour ou chez certains mammifères susceptibles d'être infectés par le bacille aviaire, tels que le cheval, le porc.

L'expérience déjà ancienne des réactions tuberculiniques montre que, chez l'homme, et particulièrement chez les jeunes enfants, les tuberculines humaines et bovines donnent des résultats sensiblement équivalents. Il est donc recommandable d'utiliser, pour la préparation de la tuberculine destinée à l'usage humain, des mélanges en parties égales de cultures d'origine humaine et d'origine bovine.

2° COMPOSITION DU MILIEU DE CULTURE. SON pH INITIAL. — Quelques Instituts sont restés fidèles au milieu de culture primitivement employé par Robert Koch (bouillon de bœuf légèrement alcalinisé, contenant 10 grammes de peptone et 40 à 50 grammes de glycérine par litre). Mais cette composition a été notablement modifiée par beaucoup d'autres, dans le but d'obtenir des cultures plus riches et plus rapides.

Les uns ont adopté le bouillon de veau additionné de 1 p. 100 de peptone, de 0,5 p. 100 de NaCl et de 4 ou 5 p. 100 de glycérine avec un pH initial allant de 7 à 7,8.

D'autres (*Ottawa*) ajoutent 1 p. 100 de glucose à une simple infusion de viande de bœuf ou de veau peptonée et glycinée, ayant un pH de 8.

Le *laboratoire bactériologique de l'Etat*, à Stockholm, emploie un bouillon contenant 3 p. 1.000 de NaCl, 10 p. 1.000 de peptone, 30 p. 1.000 de glycérine et 4 p. 1.000 de phosphate de sodium, avec un pH de 6,7 à 6,9.

L'*Institut sérothérapique d'Ivanovice* se sert de bouillon de bœuf glyciné à 9 p. 100 avec un pH de 7,2 à 7,5. A l'*Institut d'Hygiène expérimentale de Montevideo*, on fait macérer pendant vingt-quatre heures, dans le bouillon de bœuf peptoné et glyciné, des pommes de terre hachées.

La viande de cheval est préférée par les *Behringwerke* de Marburg (1 kilogramme pour 4 kilogrammes d'eau, 3 p. 100 de glycérine, 0,5 de NaCl et 1 p. 100 de peptone; le pH est de 7,1 à 7,2), et aussi par le *Lister Institute* de Londres, qui lui fait subir une digestion tryptique préalable (pH : 7,8).

Enfin chez *Merck*, à Darmstadt, on prépare un bouillon de pH : 6,6 avec de l'extrait de viande, et le laboratoire *Bruschettini*, de Gênes, utilise, outre le bouillon de viande glyciné, un milieu à l'œuf analogue à celui de Besredka.

Il est fort difficile de porter un jugement sur l'opportunité de toutes ces variantes. La plupart ne paraissent pas justifiées. Nous sommes nettement d'avis que le milieu le plus favorable au développement rapide des voiles et à la production de la tuberculine est le bouillon de veau additionné de 1 p. 100 de peptone, 0,5 p. 100 de NaCl, 5 p. 100 de glycérine et ayant, avant stérilisation, un pH de 7,2. Certains milieux synthétiques, principalement celui de *Sauton*, sont excellents pour l'obtention de cultures abondantes en corps microbiens, mais ils fournissent constamment une tuberculine moins active que les bouillons de viande peptonés.

3° AGE DES CULTURES. — La durée du séjour des cultures dans une étuve bien réglée à 38° C. exerce une influence manifeste sur leur richesse en tuberculine. Tous les laboratoires sont

d'accord pour admettre qu'elle ne doit pas être de moins de quatre semaines. Le plus grand nombre la prolonge jusqu'à six à huit semaines. Quelques-uns (*Kharkoff, Ottawa, Bucarest, Ivanovitch*) jusqu'à douze et même vingt-quatre semaines (*Burrough et Wellcome, Merck, Behringswerke*). Il ne semble pas que cette longue incubation augmente sensiblement la richesse des cultures en principes actifs.

4° MODE DE STÉRILISATION DES CULTURES. — Avant d'être mises en œuvre pour la préparation des tuberculines, les cultures sont généralement tuées par trente à soixante minutes de chauffage à 100°. Dans certains Instituts (*Kitasato*), on préfère ne pas dépasser la température de 90° ou même de 80° maintenue pendant plusieurs heures (*Leeuwarden*). D'autres ne craignent pas de prolonger le chauffage jusqu'à trois heures à 104° (*Institut sérothérapeutique de Vienne, d'Ottawa*). Quelques-uns suppriment complètement le chauffage (*Evan Sons, Lescher et Webb, Institut Oswaldo Cruz, Stockholm, laboratoire Weleminsky*) et filtrent directement sur bougies Berkefeld.

5° MODES DE FILTRATION ET DE CONCENTRATION. — Beaucoup de laboratoires (17 sur 34) procèdent d'abord à la concentration des cultures par évaporation au bain-marie jusqu'à réduction à 1/10 de leur volume primitif. Celles-ci sont ensuite filtrées, soit sur papier, soit sur bougies, soit en premier lieu sur papier, puis sur bougies.

Certains préfèrent filtrer avant de procéder à la concentration (*Ottawa, Graz, Rotterdam, Prague, Cracovie, Stockholm, Bruschettini, Duncan, Lister, Wellcome*).

La filtration est, le plus souvent (23 sur 34), effectuée sur papier. Trois Instituts emploient exclusivement les bougies Chamberland, Berkefeld ou Mandler. Au laboratoire du *Commonwealth, de Melbourne*, on utilise le filtre type Buchner, constitué par deux couches de papier-filtre, une couche d'ouate et deux autres couches de papier-filtre.

A *Bucarest*, les cultures ne sont ni filtrées, ni concentrées, mais seulement décantées après sédimentation prolongée pendant quinze à vingt jours, puis mises immédiatement en ampoules.

La technique qui consiste à évaporer sans trop de hâte les cultures au bain-marie aux environs de 100° pour favoriser au maximum l'extraction des endotoxines bacillaires par la concentration progressive de la glycérine, puis à filtrer simplement sur papier épais (papier Chardin), nous paraît incontestablement la meilleure.

6° MODES DE CONSERVATION DES TUBERCULINES CONCENTRÉES. — Les produits bruts obtenus après concentration et filtration sont ordinairement emmagasinés ou délivrés immédiatement sans qu'il soit nécessaire de les stériliser de nouveau. Cependant, quelques Instituts préfèrent leur faire subir, après répartition en ampoules, un chauffage à 60° (*Stockholm*), à 100° (*Ottawa*), ou même à 110-120° (*Ivanovice*). Chez le professeur *Kitasato*, à Tokio, le liquide filtré est aussitôt additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.

7° FORMES SOUS LESQUELLES LES TUBERCULINES SONT DÉLIVRÉES. —

Dans les laboratoires où les tuberculines sont préparées avec des mélanges de cultures bovines et humaines, ces mélanges sont généralement effectués *après concentration* et en proportions très variables : tantôt 2/3 de cultures d'origine humaine pour 1/3 de bovine (Behringswerke, de Marbourg); tantôt 3/4 de bovine et 1/4 d'humaine (Institut Pasteur de Paris).

Le plus souvent, les tuberculines sont délivrées sur la demande des médecins et des vétérinaires, soit sous la forme brute, concentrée, soit diluées et prêtes à l'usage. Le taux de la dilution, habituellement faite dans l'eau phéniquée à 0,5 p. 100, est variable; celle de 1 partie de tuberculine pour 9 d'eau phéniquée est la plus communément demandée. Mais, pour l'usage médical, beaucoup d'Instituts préparent aussi des dilutions allant de 1/10 à 1/100.000.

Au laboratoire d'*Ottawa*, la dilution des tuberculines délivrées aux vétérinaires est basée sur la valeur de l'*Unité active* de la tuberculine brute. C'est une mesure sur laquelle nous reviendrons plus loin.

En effectuant notre enquête, nous avons demandé qu'on veuille bien nous fournir quelques renseignements sur les diverses préparations dérivées des cultures de bacilles tuber-

culeux ou de la tuberculine ancienne de Robert Koch, qui sont délivrées ou mises en vente par les Instituts officiels ou privés des différents pays. Le nombre de ces préparations — (beaucoup sont des spécialités pharmaceutiques qui n'ont qu'un intérêt commercial et dont les détails de fabrication restent plus ou moins secrets) — est très considérable. Leur étude n'entre pas dans le cadre de ce travail.

Nous nous bornerons à rappeler les efforts qui ont été faits en vue, d'une part, d'isoler de la tuberculine brute les substances actives comme *antigènes tuberculeux*, susceptibles de provoquer dans les organismes la formation d'anticorps spécifiques et, d'autre part, d'en écarter les antigènes parasites (albumoses, peptones, etc.) dont les effets peuvent être plus ou moins nuisibles ou gênants.

Pour séparer ces deux ordres de substances, on a cherché soit à purifier la tuberculine brute par divers procédés de précipitation, soit à obtenir d'emblée, par la culture du bacille sur milieux synthétiques, une tuberculine ne contenant ni albumoses, ni peptones.

Ces tuberculines offrent, pour certains usages médicaux, et principalement pour le traitement des tuberculeux, des avantages dont on ne saurait contester l'importance. Outre que leur toxicité est beaucoup moindre, elles sont mieux tolérées et, partant, plus maniables.

La mesure de leur activité et leur contrôle peuvent être effectués par les mêmes techniques que celles qui sont employées pour la vieille tuberculine et dont nous allons maintenant aborder l'étude.

B. — Détermination expérimentale de l'activité des tuberculines. Méthode initiale allemande.

L'activité des tuberculines étant essentiellement variable suivant leur mode de préparation, l'origine des bacilles dont elles proviennent, la virulence de ceux-ci, la composition du milieu qui sert à les cultiver, etc., presque tous les laboratoires producteurs ont jugé indispensable de la mesurer. Quelques-uns cependant s'en abstiennent, estimant que les méthodes

actuellement en usage sont d'une application difficile et ne fournissent pas d'indications précises.

La législation de plusieurs pays a cependant imposé l'obligation de ce titrage. Tel est le cas pour l'Allemagne, le Brésil, la France, l'Italie, le Japon, la Tchéco-Slovaquie. Partout ailleurs, il n'existe aucun contrôle autre que celui exercé par les fabricants eux-mêmes.

Il est généralement effectué, — sauf quelques variantes, — suivant la technique anciennement adoptée au laboratoire de Robert Koch, modifiée en 1905 par *Otto* et mise régulièrement en œuvre par ce dernier à l'Institut de Médecine expérimentale de Francfort. Elle consiste à prendre un certain nombre de cobayes de même poids (350 à 400 grammes), sous la peau ou dans le péritoine desquels on injecte une quantité déterminée (5 milligrammes par exemple, soit 200 millions de bacilles) d'une culture de deux à trois semaines, bien émulsionnée dans l'eau physiologique. A la fin de la troisième ou de la quatrième semaine, suivant que l'inoculation virulente a été faite dans le péritoine ou sous la peau, on s'assure, par l'autopsie de quelques cobayes, que la tuberculose s'est bien développée et, dans l'affirmative, on en éprouve 2 à 4 autres par injection sous-cutanée de 0 c. c. 25 à 0 c. c. 30 d'une bonne tuberculine servant d'étalon (Standard). Ces doses doivent entraîner la mort en moins de vingt-quatre heures avec les lésions caractéristiques de l'intoxication tuberculinique. Si cette épreuve donne des résultats positifs, c'est que la tuberculisatation des cobayes est assez avancée et l'on peut alors employer tous les animaux du même lot en inoculant à chacun d'eux des quantités variables (inférieures et supérieures à 0 c. c. 25) des préparations de tuberculines dont on veut comparer la toxicité à celle de la tuberculine choisie comme étalon.

Toute tuberculine qui ne tue pas le cobaye tuberculeux en moins de vingt-quatre heures à la dose de 0 c. c. 25 est considérée comme insuffisamment active.

Cette méthode donne en général des résultats satisfaisants, mais il faut reconnaître qu'elle a l'inconvénient d'être coûteuse parce qu'elle nécessite, pour chaque échantillon, le sacrifice d'un assez grand nombre de cobayes. Il n'est pas sûr, en outre,

que les renseignements qu'elle fournit soient valables pour les autres espèces animales, en particulier pour l'homme.

C'est pourquoi plusieurs Instituts se refusent à l'employer et préfèrent s'en rapporter aux essais faits directement par les vétérinaires sur les bovins, ou par les médecins dans les services hospitaliers.

Le laboratoire vétérinaire d'*Ottawa* a récemment adopté pour ses titrages un procédé basé sur la réaction de fixation du complément, de Bordet-Gengou. Nous y reviendrons plus loin.

Outre les recherches effectuées pour l'évaluation de leur toxicité spécifique, les tuberculines sont parfois soumises à des épreuves complémentaires destinées à garantir leur stérilité. A cet effet, on les ensemence sur les milieux usuels de culture, en aérobie et en anaérobie, et on en injecte une quantité variable à des cobayes non tuberculeux pour s'assurer qu'elles ne renferment aucune substance nuisible à l'animal sain.

On trouvera, en annexe de ce rapport (*Annexe C*), un tableau résumant les réponses fournies par chacun des Instituts producteurs de tuberculine auxquels s'es adressée notre enquête.

C. — Méthodes de titrage étudiées par divers expérimentateurs et par les experts de la Commission.

Parmi les diverses méthodes qui ont été proposées pour le titrage des tuberculines, nous retiendrons seulement les suivantes :

1° La méthode de précipitation, de G. Dreyer et R. L. Wollum;

2° La méthode de titrage par la réaction de fixation du complément, de E. A. Watson et L. M. Heat, d'*Ottawa*;

3° La méthode de F. R. Long (Spermatocyt-tuberculin-réaction);

4° La méthode de von Lingelsheim-Borrel;

5° Les procédés d'épreuves par cuti- ou intradermo-réactions.

I. — MÉTHODE DE PRÉCIPITATION DE G. DREYER
ET R. L. WOLLUM.

Grâce à l'obligeance du professeur G. Dreyer, l'un de nous a pu étudier, à Oxford, la technique de cette méthode dont on peut lire une description très complète dans un article publié par *The Lancet*, le 15 novembre 1924.

Déjà en 1909, A. Calmette et L. Massol avaient préparé un sérum de bovidé tuberculeux enrichi en anticorps par des injections répétées de tuberculine, et ils avaient cherché à utiliser ce sérum pour déceler les traces de tuberculine dans le lait et dans les diverses humeurs des sujets tuberculeux. Les résultats de leurs expériences n'ayant pas été favorables, ils durent reconnaître que les tuberculines constituent de très mauvais antigènes, ce qui fut confirmé dans la suite par d'autres auteurs et, tout récemment encore, par les recherches de A. Boquet et L. Nègre (1).

C'est pourquoi G. Dreyer et L. Wollum, reprenant la même idée, se sont adressés, pour l'obtention d'un sérum précipitant, à des chevaux inoculés par voie intraveineuse avec des doses progressivement croissantes de bacilles dégraissés par l'acétone, puis formolés (vaccin diaplyte). En trois mois environ, les chevaux recevaient ainsi de 0 milligr. 1 à 225 milligrammes de bacilles. Leur sérum devenait alors fortement précipitant pour les bacilles dégraissés soumis à la digestion trypsique, et aussi pour la vieille tuberculine. Il ne donnait aucune floculation avec la malléine, ni avec la toxine diphtérique. C'est ce sérum que les auteurs utilisent, en même temps qu'une standard-tuberculine provenant de l'Institut de Médecine expérimentale de Francfort-sur-Mein, pour le titrage des tuberculines.

On prépare d'abord des dilutions de celles-ci à 1 p. 100, 1 p. 300, 1 p. 900, 1 p. 2.700, 1 p. 8.100.

Dans une série de tubes de faible diamètre on introduit, avec un compte-gouttes de Dreyer, V gouttes du sérum précipitant dilué au quart, puis, successivement, dans chacun des tubes,

(1) Ces *Annales*, 40, janvier 1926.

V, VI, VIII, X et XII gouttes de chacune des dilutions de tuberculine. On complète partout au volume de XX gouttes par addition de X, IX, VII, V et III gouttes d'eau salée physiologique à 9 p. 1.000. On agite légèrement et on porte les tubes au bain-marie à 37° en les immergeant jusqu'aux deux tiers de la colonne liquide. Les tuberculines moyennement actives fournissent ordinairement un précipité à 4 p. 900 après neuf heures, temps auquel doit être effectuée la lecture.

L'intensité de la précipitation est indiquée par les termes :

T : précipitation massive totale ;

S : précipitation visible à l'œil nu (Standard) ;

Tr : précipitation visible seulement à la loupe (trace) ;

O : pas de précipité.

Pour les précipitations intermédiaires à ces divers taux, on note : T+ ou T—, S+ ou S—, etc.

La lecture étant faite avec ces indications, il s'agit maintenant de les transposer en *Unités Standard*, l'unité de comparaison étant fournie par la tuberculine standard de Francfort, à laquelle on donne conventionnellement la valeur de 100 unités par centimètre cube. Le calcul du nombre d'unités est déduit des dilutions de tuberculine qui ont fourni un précipité entre S et Tr. On prend la moyenne des deux résultats.

Pour une détermination exacte, il est recommandé de faire 5 titrages et de prendre la moyenne des résultats chaque fois en présence de tuberculine standard.

L'appréciation du degré de floculation de certaines séries de dilutions est parfois difficile ; aussi est-il utile de se servir, pour la lecture, de l'éclairage artificiel sur fond noir. Il est nécessaire aussi de prendre certaines précautions :

a) Le sérum précipitant doit être clair, stérile, *non chauffé*. On peut le diluer au quart ;

b) Aucun des réactifs (sérum ou tuberculines) ne doit contenir d'antiseptiques ;

c) Les tubes doivent être du même calibre et très propres ;

d) Le bain-marie à 37° doit être ouvert à l'air libre.

Il ne semble pas que les variations de la teneur de la tuberculine en peptones, en sels ou en glycérine, exercent une influence sur la réaction.

Quoi qu'il en soit des résultats très favorables indiqués par

les auteurs de cette méthode, celle-ci est passible de nombreuses critiques. D'abord, il est difficile d'obtenir de bons sérums précipitants, la valeur de ceux que fournit un même animal étant extrêmement variable d'une saignée à l'autre. Ensuite, la plupart des tuberculines qu'on peut avoir à titrer sont additionnées d'antiseptiques, ce qui rend leur titrage impossible.

Enfin — objection plus grave — cette réaction n'est pas absolument spécifique, car il suffit souvent de diluer le sérum pour que celui-ci floccule et on peut obtenir un précipité presque aussi abondant en substituant à la tuberculine des extraits concentrés de bacilles paratuberculeux.

Tout cela explique pourquoi la méthode de titrage par précipitation a été abandonnée ou est généralement écartée. Nous ne pensons pas que son élégance puisse compenser ses multiples inconvénients et qu'il y ait lieu d'en recommander l'adoption pour le contrôle officiel des tuberculines.

II. — MÉTHODE DE TITRAGE PAR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT.

Des essais de titrage des tuberculines par cette méthode basée sur la réaction de Bordet-Gengou ont été entrepris en 1912 aux laboratoires Burroughs et Wellcome, à Londres, et, un peu plus tard, à l'Institut Kitasato, à Tokio. Ils fournirent des résultats si médiocres qu'on dût bientôt les abandonner.

En 1924, à la suite de nouvelles et laborieuses recherches effectuées au laboratoire d'Ottawa (Canada), E. A. Watson et L. M. Heath publièrent un mémoire (1) dans lequel ils préconisent l'emploi d'une technique dont ils se déclarent parfaitement satisfaits.

Elle consiste à déterminer *in vitro* la valeur antigène des tuberculines en présence d'un sérum riche en anticorps spécifique. Celui-ci s'obtient assez facilement en inoculant par voie intraveineuse à un cheval ou à un bœuf indemne, ne réagissant pas à la tuberculine, d'abord 1 milligramme, puis, quatorze jours plus tard, 2 milligrammes d'une culture de bacilles

(1) *Journal of the American Veterinary medical Association*, 66, n° 1, octobre 1924.

tuberculeux virulents. Le trente-cinquième jour après la première inoculation, le sérum du cheval fournissait une réaction de fixation positive à la dose de 0 c. c. 02 et celui du bœuf à la dose de 0 c. c. 033. Le premier contenait donc 50 unités par centimètre cube et le second 30.

Le cheval seul reçut alors une nouvelle inoculation de 3 milligrammes de bacilles virulents (ce fut la dernière). Sept à quatorze jours après, pendant la septième semaine de l'expérience, le maximum de la courbe de fixation fut atteint, le titre étant 0,0066 ou 150 unités par centimètre cube, alors que le sérum du bœuf donnait 0,02 ou 50 unités.

Le cheval mourut le cent treizième jour, avec une tuberculose miliaire des poumons, mais il avait fourni une quantité suffisante de sérum pour faire un grand nombre d'expériences. Ce sérum titrait 150 unités par centimètre cube avec une dose fixe de tuberculine-standard. Son activité était un peu plus grande vis-à-vis des suspensions de bacilles tuberculeux et des autres antigènes. Il était inactif sur la malléine, l'abortine et les extraits de bouillons glycélinés (1).

La dose d'antisérum la mieux appropriée au titrage des tuberculines fut précisée en préparant 5 séries de dilutions convenables de tuberculine-standard et en ajoutant à chaque série, respectivement 2 1/2, 5, 10, 20 et 30 unités d'antisérum. Les séries contenant 10 et 20 unités d'antisérum ont fourni la meilleure gradation. Alors, une dose fixe de 20 unités d'antisérum fut employée pour titrer tous les autres échantillons de tuberculines commerciales.

La quantité minimum de tuberculine ajoutée à 20 unités d'antisérum doit être celle qui est capable de fixer en totalité l'unité d'alexine ou complément. On peut dire qu'elle représente l'*unité active de tuberculine*. Les tuberculines utilisables pour le diagnostic de la tuberculose du bétail titrent 200 à 300 unités par centimètre cube. Il en est qui vont jusqu'à 600. Mais on trouve dans le commerce des tuberculines qui titrent à peine 20 unités, ou même 0 !

D'après W. et H., 750 et 1.250 unités représentent une dose

(1) Dans leur travail, W. et H. signalent les essais infructueux qu'ils ont faits en vue d'obtenir un sérum anti avec des tuberculines brutes ou des bouillons de culture filtrés et non chauffés.

convenable pour le bétail, et les résultats de leur titrage concordent généralement avec ceux des inoculations aux cobayes tuberculeux faites suivant la méthode allemande. Leur procédé aurait donc l'avantage d'être infiniment plus économique que cette dernière, tout en ayant une précision au moins égale.

D'après notre expérience, il y a lieu de faire beaucoup de réserves à ce sujet. Un trop grand nombre de facteurs biologiques essentiellement variables interviennent dans cette réaction, et rien n'autorise jusqu'à présent à admettre le parallélisme du pouvoir antigène et de la toxicité des tuberculines. Il semble plutôt que le contraire soit l'expression de la vérité. Ne constatons-nous pas, en effet, que les antigènes tuberculeux atoxiques, privés de tuberculine, l'antigène méthylique de Boquet et Nègre, par exemple, sont les plus énergiques fixateurs d'anticorps *in vitro* et les plus actifs producteurs de ces mêmes anticorps *in vivo*?

Nous ne croyons donc pas que la réaction de fixation nous offre, pour le titrage des tuberculines, des sécurités suffisantes.

III. — SPERMATOCYT-TUBERCULIN-RÉACTION (DE F. R. LONG).

Les méthodes de titrage actuellement employées ne permettant pas d'apprécier les degrés de toxicité des tuberculines, F. R. Long a proposé de prendre comme criterium la *sensibilité testiculaire des cobayes tuberculisés*. Dans un mémoire publié en 1923 (1), il a indiqué une nouvelle technique de titrage dénommée par lui *Spermatocyt-tuberculin-réaction*.

Il insiste d'abord sur le mécanisme de la réaction tuberculinique qui, pour lui, se traduit par deux phénomènes distincts : l'*exsudation* et la *nécrose*. L'exsudation, associée à l'hyperémie active, provoque l'œdème rouge caractéristique de la réaction cutanée. La nécrose de la peau est plus rare. Elle dépend de plusieurs facteurs, notamment du degré de sensibilité du tissu dans lequel se fait l'injection, du type de ce tissu et de la dose de tuberculine. Comme les tissus de la peau, principalement le conjonctif et l'épithélium squammeux, sont relativement résis-

(1) F. R. LONG, *Journ. of Infectious Disease*, octobre 1923, p. 368.

tants, la nécrose n'apparaît qu'avec de fortes doses de tuberculine. Au contraire, dans le testicule, qui réagit fortement, l'injection de tuberculine provoque une coagulation typique des spermatocytes et des cellules germinatives qui en dérivent.

La réaction spermatocytaire à la tuberculine présente deux phases : une *précoce*, une *tardive*.

Dans la phase précoce, on note, outre une hyperémie et un œdème inflammatoire, une nécrose coagulante des spermatocytes et des spermatides, l'augmentation de calibre des tubuli, et une division désordonnée des cellules germinatives : spermatogonies, spermatocytes, spermatides et spermatozoaires. Seules, les spermatogonies paraissent normales et subsistent après la résorption des cellules nécrotiques.

La phase tardive s'observe trois à quatre semaines après l'injection de tuberculine. A ce moment, les tubuli sont atrophiés, limités par une membrane basale et une simple couche de cellules épithéliales : les spermatogonies. Toutes les autres figures de multiplication des cellules germinatives ont disparu.

La spécificité de cette réaction à la tuberculine paraît incontestable. Des injections de tuberculine chez les cobayes normaux ne créent jamais ces modifications tissulaires, non plus que celles d'extraits de bacilles paratuberculeux.

Histologiquement, le type de cette réaction est semblable à celui de la réaction cutanée, à l'exception d'une dégénérescence et d'une nécrose plus accentuées et qui sont dues à une plus grande sensibilité des cellules germinatives. La technique de cette méthode est la suivante :

Des cobayes mâles, de 400 grammes environ, sont préalablement infectés par injection sous-cutanée d'une émulsion bacillaire peu virulente, de manière à provoquer, au bout d'un mois, l'apparition d'un nodule caséeux dans la région lymphatique correspondante.

A ce moment (après un mois), on injecte dans l'un des testicules 0 c. c. 1 d'une solution de tuberculine et, suivant qu'on désire examiner la réaction précoce ou la réaction tardive, on sacrifie l'animal après trente-six heures, ou après un mois.

Les dilutions de tuberculine sont faites à 0,1, 0,01, 0,001 et 0,0001 pour les tuberculines non concentrées ; à des doses

dix fois moindres pour les tuberculines concentrées. Pour chaque dilution, on prend deux animaux tuberculisés et, en plus, deux animaux sains. Ceux-ci, servant de témoins, sont injectés avec les solutions les plus concentrées. Au total, 10 cobayes (dont 8 infectés) suffisent pour le titrage d'une tuberculine.

Le résultat de la réaction est obtenu par l'examen histologique d'une coupe médiane du testicule inoculé. En raison des différenciations des éléments pour un œil non exercé, il est préférable de recourir à l'étude de la réaction tardive. Si, par exemple, on a procédé à l'injection intratesticulaire de 4 dilutions de tuberculine, on constatera que les trois plus fortes ont produit la nécrose des cellules germinatives, à l'exception des spermatogonies qui persistent à la périphérie des tubuli. La quatrième au contraire a laissé intacts, dans les tubulis, les spermatocytes et leurs éléments dérivés, ainsi que la spermatogénèse. La distinction entre ces images est très nette et constitue une base pour la définition de l'unité.

Celle-ci peut, arbitrairement, être considérée comme étant la quantité de tuberculine qui arrête la spermatogénèse et, dans le cas indiqué ci-dessus, elle correspondrait à la troisième dilution. Si celle-ci est, par exemple, de 1/10.000, il s'ensuit que 1 cent. cube de cette tuberculine contient 10.000 unités spermatocytiques.

L'unité *spermatocytiq*ue est donc la quantité de tuberculine suffisante pour abolir la spermatogénèse dans la majorité des tubulis par l'injection de 0 c. c. 1 de cette substance dans le testicule d'un cobaye de 400 grammes atteint d'une tuberculose bénigne datant d'un mois.

D'après F. R. Long, les avantages de ce procédé seraient : la spécificité absolue de la réaction, sa sensibilité dix fois plus grande que la réaction intradermique, la constance de ses résultats et la possibilité de conserver une preuve permanente du titrage de chaque produit.

Par contre, la nécessité d'attendre trois à quatre semaines les éléments d'information désirables, les délais de préparation des coupes histologiques, les difficultés inhérentes à l'étude minutieuse de celles-ci, paraissent être de sérieux obstacles à son adoption dans la pratique.

IV. — MÉTHODE D'INOCULATION INTRACÉRÉBRALE (VON LINGELSHEIM-BORREL).

Instituée par von Lingelsheim en 1898, expérimentée par A. Borrel en 1909 (1), cette méthode, basée sur l'inoculation intracérébrale, comparativement chez le cobaye sain et chez le cobaye tuberculeux, est seulement utilisable pour les tuberculines purifiées par précipitation. Elle ne peut pas être employée pour le titrage des tuberculines brutes, car la glycérine, la peptone et les impuretés que celles-ci renferment possèdent, pour les cellules nerveuses, une toxicité propre qui ne permet plus d'apprécier les effets toxiques dus à la tuberculine seule.

D'autre part, Neufeld a montré que ce procédé n'est pas spécifique, car l'inoculation intracérébrale des précipités alcooliques de bouillon glyceriné pur produit les mêmes effets.

Nous ne les retenons donc pas.

V. — PROCÉDÉS D'ÉPREUVES PAR CUTI OU INTRADERMO-RÉACTIONS.

La réaction cutanée de von Pirquet est commode pour vérifier l'activité des tuberculines chez l'homme tuberculeux. Elle permet de comparer entre eux les effets de plusieurs dilutions (généralement de 1 p. 5 à 1 p. 50) d'une même tuberculine ou de tuberculines différentes. Mais les résultats qu'elle fournit ne sont jamais bien précis. Ils varient suivant la sensibilité des sujets, qui est très différente de l'un à l'autre, et suivant la quantité de tuberculine qui reste sur la petite plaie de scarification.

Quoique beaucoup plus douloureuse, la méthode d'inoculation intradermique lui est certainement préférable, parce qu'elle permet d'introduire *dans le derme* une quantité assez exactement mesurée de liquide sans que celui-ci se répande à l'extérieur, et de telle sorte qu'on soit sûr qu'il est absorbé.

Sa technique fut indiquée d'abord par Mantoux en 1908 et proposée par lui pour le diagnostic de l'infection tuberculeuse chez l'homme. Elle consiste à introduire dans le derme, avec

(1) *Société de Biologie*, 6 février 1909.

une aiguille fine et courte, montée sur une seringue à injection, 1 goutte ou, au maximum, $1/10$ de cent. cube d'une tuberculine brute diluée à 1 p. 5.000. Le lieu d'élection, chez l'homme, est la face antérieure de la cuisse ou du bras; chez le bœuf, le sillon sous-caudal qui part de chaque côté de la marge de l'anus; chez le porc, la face antéro-externe de l'oreille (Moussu).

Lorsque la réaction est négative, la minime lésion traumatique provoquée par l'aiguille n'est plus visible après quarante-huit heures. Si la réaction doit être positive, elle est déjà visible après quelques heures et atteint, en général, son acmé vers la quarante-huitième heure. Elle a un aspect caractéristique, en « cocarde » : infiltration nodulaire centrale, rose ou rouge vif, entourée d'un halo rosé d'érythème. L'infiltration centrale peut avoir de 1 à 3 centimètres de diamètre. Le halo périphérique a des dimensions très variables qui peuvent atteindre la largeur de la paume de la main.

Chez les petits animaux de laboratoire, le cobaye en particulier, avec 1 goutte de dilution de tuberculine brute à 1 p. 10, la réaction positive consiste en une infiltration œdémateuse du derme, de couleur blanche ou rosée, accompagnée souvent d'une suffusion hémorragique. Elle atteint son complet développement quarante-huit heures après la piqûre. Son diamètre est de 12 à 18 millimètres.

A la suite des excellents résultats obtenus avec cette méthode par Mantoux et Moussu pour le diagnostic chez l'homme et chez les bovidés, puis par Römer au cours de recherches expérimentales, Löwenstein signala l'intérêt qu'elle peut présenter pour le titrage des tuberculines. Mais ce ne fut que tout récemment que Paul Lewis et Aronson en Amérique, A. J. Eagleton et E. M. Baxter en Grande-Bretagne, Meister-Lucius und Brünig à Hoechst, l'ont étudiée et mise en pratique. La technique utilisée est la suivante :

On procède d'abord à l'infection tuberculeuse d'un lot de cobayes de même taille, de même poids (environ 300 grammes), et, autant que possible, de même race. A cet effet, on leur injecte, soit par voie sous-cutanée, soit par voie intrapéritonéale, 0 milligr. 1 de bacilles virulents de type bovin. Trois semaines environ après l'infection, on injecte à quelques animaux, sous la peau, 0 gr. 02 d'une tuberculine-étalon, pour vérifier leur

état de sensibilité. Si la réaction est franchement positive, on pratique, deux ou trois jours après, l'injection *intradermique* des tuberculines à titrer, diluées à des taux progressivement croissants, de 1/10 à 1/1.000 par exemple. La lecture et la notation du degré de la réaction sont faites après vingt-quatre, quarante-huit et soixante-douze heures. Suivant son intensité, on marque par des chiffres (1, 2, 3, 4) ou par des signes les résultats obtenus.

Ces injections intradermiques se font aisément sur la surface abdominale des animaux, rasée ou traitée par un liquide épilatoire, puis lavée à l'eau bouillie et soigneusement essuyée. Il faut choisir de préférence des cobayes à peau blanche, chez lesquels la lecture des réactions est plus facile. On prépare ainsi une aire cutanée assez large pour l'injection de 10 à 16 dilutions différentes.

Ce procédé permet de titrer, sur le même animal, au moins deux tuberculines à côté de la tuberculine-étalon. Celle-ci est indispensable à la comparaison des réactions.

Pour éviter les erreurs d'interprétation des résultats, il est recommandable de prendre les précautions suivantes :

1° Les dilutions doivent être récemment préparées en changeant de pipette pour chacune d'elles et, bien entendu, pour chaque échantillon différent;

2° On se servira, pour injecter chaque dilution, d'une seringue préalablement bien lavée et d'aiguilles courtes et fines;

3° On s'assurera que chaque injection est bien poussée dans le tissu dermique et non sous la peau.

Avec cette méthode, le fait de pratiquer *plusieurs injections* sur le *même animal* atténue les inconvénients qui peuvent résulter de l'inégale sensibilité des divers cobayes. Elle a, en outre, l'avantage d'exiger un beaucoup moins grand nombre d'animaux, et elle permet d'apprécier aisément l'activité de divers échantillons de tuberculine. Enfin, elle est d'une application facile et rapide.

D'après notre expérience, elle est incontestablement préférable à toutes celles que nous avons décrites. C'est donc sur elle que nous arrêtons notre choix.

Il importe cependant d'observer que certaines tuberculines qui, même à des taux de dilution élevées, donnent des réactions

positives chez le cobaye, n'en fournissent que de négatives chez le bœuf tuberculeux. On ne doit donc pas absolument conclure à l'activité pour l'homme ou pour le bœuf d'une dilution de tuberculine qui se montre active pour le cobaye. C'est pourquoi le National Institute for Medical Research de Londres a chargé MM. Douglas, Buxton (de Cambridge) et le major Dunkin d'étudier le titrage par inoculation intradermique chez les *bovidés*. La conclusion de leurs recherches a été que cette méthode est la seule qui donne des garanties suffisantes pour établir l'activité d'une tuberculine destinée au diagnostic de la tuberculose des vaches, si l'on prend soin de faire, chez le même animal, deux injections intradermiques successives avec la même dilution à quarante-huit heures d'intervalle. La seconde injection donne alors constamment une réaction plus nette.

D. — Recherches des experts de la Commission.

La multiplicité des méthodes employées jusqu'ici par les divers laboratoires pour le titrage des tuberculines, et le fait que chacune d'elles est encore discutée, nous ont engagés à entreprendre nous-mêmes des recherches qui puissent nous permettre d'en apprécier la valeur respective.

Nous avons commencé par préparer des tuberculines en utilisant les milieux synthétiques de culture qui nous ont paru le mieux appropriés à leur production. Ensuite, comparativement avec les nôtres et avec la tuberculine de l'Institut Pasteur de Paris, nous avons étudié un certain nombre d'échantillons de tuberculines commerciales qui nous ont été remis par la Section d'Hygiène de la Société des Nations.

a) TUBERCULINES SYNTHÉTIQUES. — Nous avons employé trois souches bacillaires différentes :

- 1° Une souche humaine assez virulente (Ratti);
- 2° Une souche bovine très virulente (Vallée);
- 3° Une souche de BCG (Bacille Calmette Guérin) rendue avirulente et non tuberculigène par 230 cultures successives sur bile de bœuf glycerinée à 5 p. 100.

Les milieux employés furent les suivants :

1° A titre de comparaison, le bouillon de veau peptoné et glyciné à 4 p. 100 qui sert à la préparation des tuberculines à l'Institut Pasteur.

2° Le milieu de Sauton amené, avec l'ammoniaque pure, au pH : 7,2 (avant stérilisation) :

	GRAMMES
Asparagine	4,
Acide citrique	2
Phosphate bipotassique	0,5
Citrate de fer ammoniacal	0,5
Sulfate de magnésie	0,5
Eau distillée	1.000

3° Le milieu de Calmette et Massol :

Carbonate de soude	1
Sulfate ferreux	0,04
Sulfate de magnésium	0,05
Phosphate de potassium	1
Chlorure de sodium	8,5
Glucose	10
Glycérine	40
Peptone	10
Eau distillée	1.000

4° Milieu de A. Borrel :

Sulfate acide de potassium	0,25
Monophosphate de potassium	0,50
Sulfate de magnésium	0,25
Nitrate de sodium	1
Carbonate d'ammonium	1
Asparagine	4,50
Glucose	5
Mannite	5
Glycérine	20
Silicate de potassium	0,02
Sulfate de fer	0,03
Eau distillée	1.000

Chacune des trois souches bacillaires fut ensemencée dans trois ballons contenant 100 cent. cubes de chaque liquide et portés à l'étuve à 38° pendant six semaines.

On constata qu'alors que le BCG se développait très rapidement et abondamment sur le milieu de Sauton, sa culture ainsi

que celle du bacille bovin et du BCG sur le milieu de Borrel, restaient très grêles.

Les tuberculines qu'on obtint par la concentration à 1/10 du contenu de chacun des ballons furent utilisées avec la tuberculine de l'Institut Pasteur employée comme étalon, et aussi avec diverses paratuberculines, ainsi qu'avec la malléine.

Nous avons étudié comparativement leur titrage :

- 1° Par la réaction de fixation du complément;
- 2° Par précipito-réaction;
- 3° Par inoculation intradermique sur cobayes sensibilisés;
- 4° Par cuti-réaction chez des sujets humains tuberculeux.

b) SÉRUM ANTICORPS. — Pour nos expériences relatives aux réactions *in vitro* (fixation du complément et précipito-réaction), nous avons dû préparer un sérum antituberculeux en immunisant un cheval, non avec la tuberculine brute, qui ne possède par elle-même presque aucune propriété antigène, mais au moyen de bacilles BCG. Ceux-ci furent émulsionnés dans l'eau physiologique formolée à 5 p. 100, conservés ensuite à l'étuve à 37° pendant un mois, puis à la température du laboratoire.

Notre cheval reçut d'abord deux fois par semaine, puis toutes les semaines, par voie intraveineuse, des doses croissantes de ces bacilles : 1, 2, 4, 6, 15, 30, 50, 75 et 100 milligrammes. Toutes ces inoculations furent faites dans l'espace de deux mois et furent suivies d'une injection de 0 c. c. 2 de tuberculine brute. Au cours du troisième mois d'immunisation, le cheval reçut encore trois nouvelles injections, chacune de 100 milligrammes de bacilles. A la suite des fortes réactions thermiques qu'elles provoquèrent, on revint, pendant le quatrième mois, aux injections de faibles doses, de 1/10, 1, 2, 5 milligrammes, qui furent continuées jusqu'à la fin du cinquième mois. Après deux mois de repos, le cheval reçut une série d'injections intraveineuses de BCG vivants. Nous reproduisons d'ailleurs ci-après la courbe d'immunisation de ce cheval.

Le titrage des anticorps du sérum ainsi obtenu fut régulièrement effectué, suivant la technique de Calmette et Massol, en présence de l'antigène méthylique de Boquet et Nègre et,

comparativement, avec la tuberculine brute diluée à 1 p. 50 (0 c. c. 5).

Nul au début, le taux des anticorps s'est rapidement élevé. Après un mois et demi de traitement, il atteignait 400 unités par centimètre cube. Il resta à ce niveau pendant six semaines, pour tomber ensuite à 100 unités. De nouvelles injections de BCG le firent remonter à 250 unités.

Avec l'antigène méthylique, le taux des anticorps s'est toujours montré notablement supérieur à celui obtenu avec la tuberculine brute.

1^o EXPÉRIENCES DE TITRAGE PAR LA RÉACTION DE FIXATION DU COMPLÉMENT.

Des essais préliminaires nous ayant fait constater que la dilution à 1 p. 20 était, pour notre tuberculine-étalon, la mieux appropriée, nous l'avons le plus généralement employée à la dose uniforme de 0 c. c. 5.

Pour comparer entre elles la valeur antigène des tuberculines, il est avantageux d'exprimer en chiffres à quel nombre d'unités antigènes elles correspondent par centimètre cube. Il suffit, à cet effet, d'établir le rapport entre la quantité d'alexine utilisée et la quantité minimum d'antigène qui fixe la totalité de l'alexine mise en œuvre. Ce chiffre, multiplié par le taux de la dilution de l'antigène, donne le nombre d'unités que renferme celui-ci par centimètre cube.

Par exemple, une tuberculine qui fixe à partir de 0 c. c. 5 d'une dilution à 1 p. 20 a pour valeur $\frac{2}{0,5} \times 20 = 80$ unités.

Une autre qui fixe à partir de 0 c. c. 3 aura comme valeur $\frac{2}{0,3} \times 20 = 132$ unités, etc...

Les résultats ainsi obtenus ne varient pas, pourvu que le système hémolytique soit constant.

Évaluée d'après cette méthode, la valeur antigène de notre tuberculine-étalon correspondait à 130 unités (1).

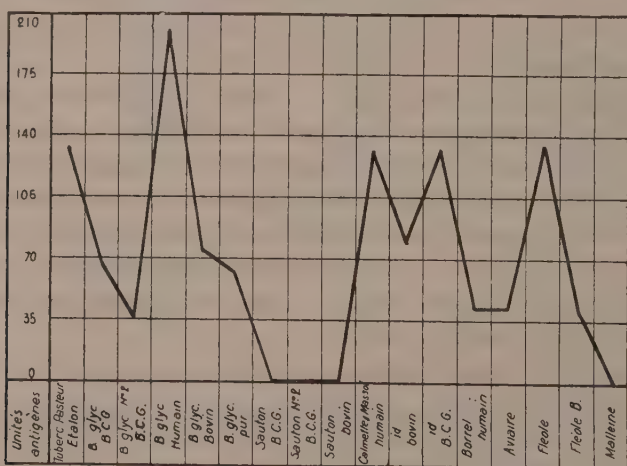
(1) On peut encore se servir, pour la détermination de la valeur d'une tuberculine, soit d'une quantité fixe d'alexine et d'antigène et de doses croissantes de sérum, soit d'une quantité constante d'antigène et de sérum, et de doses

Seule, la tuberculine préparée avec la souche de bacille humain Ratti (en bouillon glycéринé) se montre plus active que l'étalon. Elle titrait 200 unités.

Trois autres ne différaient pas sensiblement de l'étalon : c'étaient celles préparées avec la souche humaine et avec le BCG sur milieu de Calmette et Massol, et avec une paratuberculine (fléoline).

Par contre, les trois tuberculines obtenues du milieu de Sauton, et la malléine, n'avaient aucun pouvoir fixateur. La valeur antigène des autres tuberculines variait entre 80 et 35 unités. Enfin nous avons reconnu que le bouillon peptoné glycéринé pur, concentré au dixième de son volume primitif, a une valeur antigène de 60 unités.

La valeur en unités antigènes de chacune de nos tuberculines est reportée en diagramme dans la courbe II ci-après :



COURBE II. — Valeurs en unités antigènes des diverses tuberculines.

2° EXPÉRIENCES DE TITRAGE PAR LA MÉTHODE DE PRÉCIPITATION.

Au cours de l'immunisation de notre cheval en vue de l'obtention d'un sérum anti qui pût être utilisé pour nos expé-

croissantes d'alexine. Nous avons également employé cette méthode. Elle fournit des chiffres un peu plus élevés que la précédente. Ainsi la tuberculine-étalon donnait 160 unités au lieu de 130. Mais le rapport entre les deux procédés reste le même.

TABLEAU I. — Essais de titrage des tuberculines par floculation avec un antiserum.

Tuberculines	DILUTIONS				
	1/100	1/1.000	1/2.500	1/5.000	1/10.000
Etalon	+++	+++ (3 heures).	++ (3 heures).	++ (3 heures).	+
Humaine (Borrel).	+++	+++ (3 heures).	++ (3 heures).	++ (3 heures).	+
Humaine (bouillon glycéroiné).	+++	+++ (3 heures).	++ (3 heures).	++ (3 heures).	+
Humaine (C. et M.).	+++	++ (3 heures).	+	+	0
Bovine (C. et M.).	+++	+++ (3 heures).	++ (5 heures).	++ (7 heures).	0
B. C. G. sur Sauton (n° 2).	+++	+++ (3 heures).	++ (5 heures).	++ (7 heures).	0
B. C. G. sur Sauton (n° 4).	+++	+++ (5 heures).	++ (7 heures).	0	0
B. C. G. bouillon glycéroiné (n° 4).	++	++ (7 heures).	0	0	0
B. C. G. bouillon glycéroiné (n° 2).	++	++ (7 heures).	0	0	0
B. C. G. (C. et M.).	+++	++ (7 heures).	0	0	0
Bovine Sauton	+++	++ (5 heures).	0	0	0
Bovine bouillon glycéroiné	+++	++ (3 heures).	0	0	0
Aviaire.	++	++ (7 heures).	0	0	0
Fléoline	+++	0	0	0	0
Fléoline 1924	0	0	0	0	0
Bouillon glycéroiné pur	0	0	0	0	0
Malléine	0	0	0	0	0

riences de titrage, nous avons fait un grand nombre d'essais de précipitation de tuberculine de l'Institut Pasteur diluée de $1/5$ à $1/50$ en présence de 0,1 à 2 cent. cubes de sérum. Après mélange, les tubes étaient immergés dans un bain-marie à 45° pendant trois heures, puis portés à l'étuve à 37° . Aucune floculation ne se produisait. Nous n'avons obtenu ainsi que des résultats négatifs. Nous n'avons pas été plus heureux en mettant en présence d'une quantité fixe de sérum (0 c. c. 5) des quantités croissantes de tuberculine diluée à $1/25$, $1/50$, $1/100$ et $1/300$.

Plus tard (deux mois et demi après le début de l'immunisation) notre sérum ayant fourni à la dose de 1 cent. cube un floculat avec 20 cent. cubes de tuberculine-étalon diluée à $1/400$, nous renouvelâmes nos essais en utilisant toujours ce volume de 20 cent. cubes de tuberculine diluée à des taux variables, de $1/100$ à $1/10.000$. Après trois heures de séjour au bain-marie à 45° nous faisons une première lecture, puis une seconde et une troisième après cinq et sept heures.

Par cette méthode, le bouillon glycérimé, la malléine et la fléoline n'ont donné aucune trace de floculat. La tuberculine-étalon (de l'Institut Pasteur) floculait nettement jusqu'à 1 p. 10.000. Il en était de même pour nos tuberculines préparées avec le bouillon glycérimé ou le milieu de Borrel. Celles obtenues avec les bacilles humains et bovins sur milieu de Calmette et Massol, et avec le BCG sur milieu de Sauton, floculèrent jusqu'à $1/5.000$. Celles préparées avec le BCG sur bouillon glycérimé et sur le milieu de Calmette et Massol, avec le bacille bovin sur bouillon glycérimé et sur milieu de Sauton ainsi que la tuberculine aviaire floculaient jusqu'à $1/1.000$. Enfin la fléoline ne floculait que jusqu'à $1/100$.

Le tableau I résume nos observations.

3° EXPÉRIENCES DE TITRAGE PAR INTRADERMO-RÉACTION SUR LE COBAYE SENSIBILISÉ.

Nous avons utilisé des cobayes de même poids (350 grammes, à peau blanche ou rose) inoculés avec une émulsion aussi homogène que possible de bacilles bovins (souche Vallée) à la dose de $1/100$ de milligrammes, depuis cinq semaines, sous la

TABLEAU II. — Intradermo chez les cobayes tuberculisés.

	1/500	1/750	1/1.000	1/1.250	1/1.500	1/2.000	1/2.500	1/3.000
<i>Tuberculine-étalon.</i>	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
<i>Milieu et souche :</i>								
Bouillon glycéринé humain	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
Sauton bovin	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
Sauton B. C. G. (2)	+++	+++	+++	++	++	++	++	+
C. M. humain	+++	+++	+++	++	++	++	++	0
Sauton B. C. G. (1)	+++	+++	+++	++	++	++	0	0
Borrel humain	+++	+++	+++	++	++	0	0	0
C. M. et B. C. G.	+++	+++	+++	++	++	0	0	0
Bouillon glycéринé bovin	++	++	+	0				
C. M. bovin	++	+	0	0				
Bouillon glycéринé B. C. G.	++	+	0	0				
Bouillon glycéринé B. C. G. 4923	++	0	0	0				
Aviaire	0	0						
Fléoline	0	0						
Bouillon glycéринé	0	0						
Malléine	0	0						

peau d'une cuisse, de telle sorte que le ganglion inguinal correspondant soit manifestement tuméfié. Nos animaux étaient rasés sur toute la surface abdominale. Nous disposions ainsi d'une aire suffisante pour l'injection de dix ou douze dilutions sur le même animal.

La quantité de liquide introduite dans le derme était toujours de 0 c. c. 1. On notait les résultats observés après vingt-quatre heures, deux et trois jours : rougeur, infiltration œdémateuse, suffusion hémorragique.

Le plus souvent la réaction est à son acmé à la quarante-huitième heure. En règle générale, nous avons pratiqué sur le même cobaye l'injection de trois séries de quatre dilutions : une de tuberculine-étalon et deux des tuberculines à titrer.

Nos premiers essais furent faits avec des dilutions à 1/500, 1/750, 1/1.000 et 1/1.250, ce qui correspond à 1/5.000, 1/7.500, 1/10.000 et 1/12.500 de tuberculine pure. Ces doses permirent déjà la différenciation de quelques produits. Pour la tuberculine-étalon, pour l'une de celles préparées avec le BCG sur milieu de Sauton, et pour quelques autres, il fallut faire des dilutions encore plus étendues, de 1/1.500, 1/2.000, 1/2.500 et jusqu'à 1/3.000.

Les mêmes déterminations effectuées sur un autre lot de cobayes tuberculisés fournirent des résultats tout à fait analogues. Très rarement quelques animaux donnaient des réactions dissemblables, de sorte qu'on peut considérer cette méthode comme suffisamment sensible et précise.

Le tableau II résume les observations que nous avons pu faire sur les diverses tuberculines préparées par nous.

4° ESSAIS DE TITRAGE PAR CUTI-RÉACTION SUR LES MALADES TUBERCULEUX.

Il importe d'observer que les sujets humains tuberculeux présentent d'énormes variations de sensibilité cutanée vis-à-vis d'une même tuberculine et qu'en outre il est impossible de savoir quelle est exactement, ou approximativement, la quantité de tuberculine qui a pénétré dans le derme après scarification simple de celui-ci.

Nous avons estimé pourtant qu'il y avait lieu de rechercher

TABLEAU III. — Cuti-réactions chez les malades tuberculeux.

MILIEU-SOUCHE	TUBERCULINE-ÉTALON DE L'INSTITUT PASTEUR DILUÉE AU				TUBERCULINES DIVERSES DILUÉES AU		
	1/10	1/100	1/500		1/10	1/100	1/500
C. M. bovin	++	++	+		++	+	+
Sauton B. C. G., n° 2.	++	++	+		++	+	0
Sauton bovin.	++	++	+		++	+	0
Bouillon glycérimé B. C. G.	+++	+	0		++	0	0
C. M. et B. C. G.	++	+	0		++	0	0
C. M. et B. C. G.	+	0	0		0	0	0
C. M. humain	++	0	0		+	0	0
C. M. humain.	++	++	+		++	0	0
Bouillon glycérimé bovin.	++	+	0		++	0	0
Aviaire.	++	+	±		±	0	0
Aviaire.	++	+	±		±	0	0
Sauton B. C. G., n° 1.	+++	++	+		0	0	0
Sauton B. C. G., n° 4.	+	0	0		0	0	0
Bouillon glycérimé pur.	++	+	0		0	0	0
Fléoline	++	+	0		0	0	0
Malléine	±	0	0		0	0	0
Malléine	++	+	±		0	0	0

si la cuti-réaction pratiquée en séries sur le même sujet pouvait servir à apprécier la valeur respective de diverses tuberculines.

Grâce à l'obligeance de M. le professeur Léon Bernard qui a mis son service de tuberculeux pulmonaires de l'hôpital Laënnec à notre disposition, nous avons pu choisir un certain nombre de malades atteints de formes cliniques assez semblables (tuberculose ulcéro-caséreuse, peu fébrile, avec expectoration bacillifère).

Les scarifications de l'épiderme furent pratiquées à la région externe du bras, et la réaction fut considérée comme positive (+) lorsqu'il existait, après quarante-huit heures, une zone érythémateuse plus ou moins large, accompagnée d'infiltration dermique nettement perceptible au toucher. On put ainsi constater qu'un bon nombre de sujets réagissaient positivement avec la dilution à 1 p. 500 de la tuberculine-étalon de l'Institut Pasteur.

Le tableau III résume les résultats de ces divers essais.

E. — Essais de titrage des tuberculines commerciales.

La Section d'Hygiène de la Société des Nations nous a remis pour ces essais 19 échantillons de tuberculines de différentes provenances et qu'on trouvera numérotés ci-après de I à XIX.

Nous les avons utilisés en vue de comparer, pour chacun d'eux, les résultats fournis par les quatre méthodes suivantes :

- 1° Réaction de fixation du complément;
- 2° Réaction de floculation ou de précipitation;
- 3° Cuti-réactions chez l'homme tuberculeux;
- 4° Intradermo-réactions sur le cobaye sensibilisé.

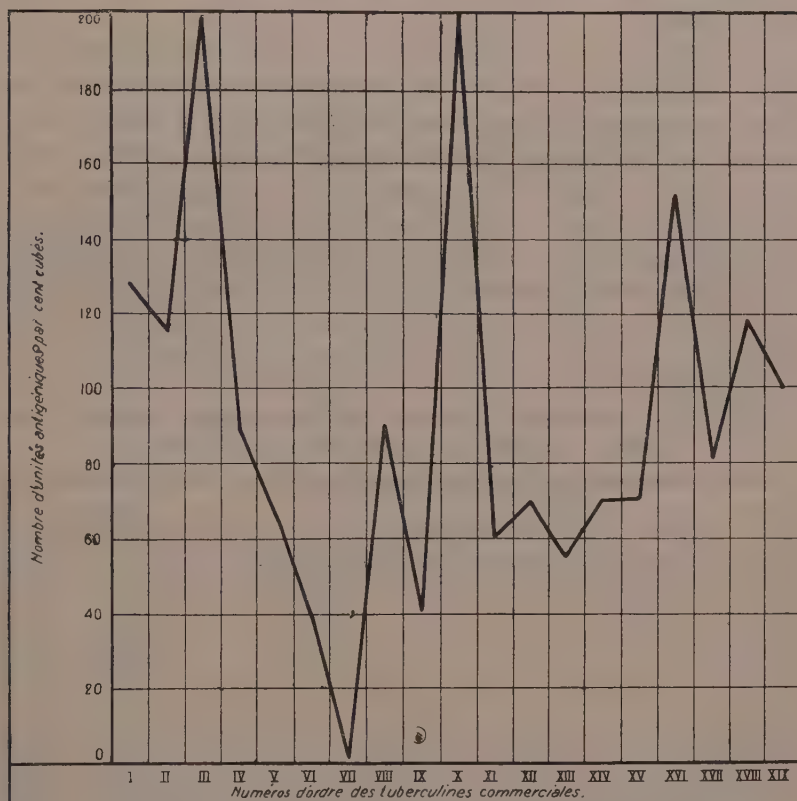
1° MÉTHODE DE TITRAGE PAR LA FIXATION DU COMPLÉMENT.

Les réactions furent pratiquées avec des doses croissantes de 0 c. c. 1 à 1 cent. cube d'une dilution à 1/20 de chacun des spécimens, deux doses hémolysantes d'alexine au 1/15, et 0 c. c. 1 de notre sérum antituberculeux de cheval.

Pour la tuberculine n° VI, la dilution à 1/20, étant trop faible, fut ramenée à 1/10.

Pour la tuberculine n° III, la dilution à 1/20 étant, au contraire, trop forte, elle fut portée à 1/30.

Ces titrages ayant été répétés chacun plusieurs fois, nous



*La réaction est pratiquée avec des doses croissantes (de 0,1 à 1 cc.) d'antigène dilué au 1/200.
La tuberculine VIII est une tuberculine desséchée, privée de glycérine.*

COURBE III. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par la réaction de fixation du complément.

donnons les moyennes de leurs résultats exprimées en unités antigènes contenues dans 1 cent. cube du produit brut.

Il ne semble pas que la présence d'antiseptiques (acide phénique) dans certaines tuberculines ait sensiblement modifié le sens de la réaction.

Un seul échantillon (n° VII) était complètement dépourvu de toute propriété antigène et n'a, par conséquent, pas pu être

soumis au titrage. Il s'agissait d'une tuberculine précipitée.

L'examen des chiffres du tableau n° IV et celui de la courbe III montrent que les tuberculines aviaires XVII et XIX ont une valeur antigène correspondant respectivement à 80 et à 100 unités.

Les plus faibles et les plus fortes valeurs trouvées sont de 40 et 200 unités. Il est intéressant de noter que chacun de ces taux a été atteint par une tuberculine bovine et par une tuberculine sans albumose : la tuberculine III (albumose-freie) et la tuberculine bovine X titraient 200 unités, tandis que l'albumose-freie VI et la tuberculine bovine IX titraient à peine 40 unités.

Nous insistons de nouveau sur les difficultés de cette technique. Elles résultent surtout de l'activité variable de l'alexine utilisée. Il est, en tous cas, indiqué de ne se servir, pour cette réaction, que d'une alexine hémolysant à la dose de 0 c. c. 1.

TABLEAU IV. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par la méthode de fixation du complément.

NUMÉROS D'ORDRE DES TUBERCULINES	UNITÉS ANTIGÉNIQUES par centimètre cube.
I	130
II	115
III	200
IV	90
V	70
VI	40
VII	"
VIII	90
IX	40
X	200
XI	60
XII	70
XIII	55
XIV	70
XV	70
XVI	150
XVII	80
XVIII	115
XIX	100

2° MÉTHODE DE TITRAGE PAR FLOCCULATION (OU PRÉCIPITATION).

Nous avons effectué toutes nos expériences avec la même technique qui consistait à ajouter 1 cent. cube de notre sérum antituberculeux de cheval à 20 cent. cubes de tuberculine diluée

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, PARIS

** Vient de paraître :*

— TROUBLES — DES ÉCHANGES NUTRITIFS

PHYSIOPATHOLOGIE, PATHOLOGIE, THÉRAPEUTIQUE

Par Ch. ACHARD

Professeur de Clinique Médicale
à la Faculté de Médecine de Paris
Membre de l'Académie de Médecine.

Deux volumes formant en tout 1220 pages, avec 167 figures. 110 fr.

CE beau livre est le résultat et la synthèse de quinze années d'un patient labeur, et l'on ne sait ce qui doit être le plus admiré des deux rares qualités qu'il unit : le souci d'une documentation exhaustive, la sûreté de jugement dans la construction.

Conçu sur un plan nouveau, écrit d'une seule main (et pour ce motif plus homogène que ces ouvrages qui ne sont que des compilations écrites en collaboration), ce volume groupe une « bibliothèque » de documents sur les innombrables recherches dont la nutrition normale et pathologique a fourni la matière. Il fixe l'état de nos connaissances au premier quart du xx^e siècle sur cette partie de la médecine qui comprend tant de questions complexes, discutées, et en perpétuelle évolution.

Dans les traités classiques, les descriptions pathologiques des troubles nutritifs ont encore pour base principale les symptômes dominants dont on s'applique à faire des maladies distinctes. Dans cet

ouvrage, conformément à l'évolution de la médecine, c'est la physiologie qui sert de base à leur étude. Les désordres qui surviennent dans les actes élémentaires de la nutrition y sont envisagés non pour définir les maladies, mais pour guider l'interprétation pathogénique des phénomènes morbides observés en clinique. Plutôt qu'une description des maladies de la nutrition, telles que les distingue la pathologie classique, on y trouve exposés les troubles de la nutrition dans les maladies, tels que doit les étudier la pathologie générale.

Un index alphabétique très complet, qu'on pourra consulter comme un véritable « dictionnaire », facilitera la recherche des renseignements que l'ouvrage contient, sur des points particuliers.

EXTRAIT DE LA TABLE

Échanges gazeux.

Les gaz de l'organisme. — Leurs propriétés. — Leur circulation. — Métabolisme basal.
Troubles des mouvements de l'air dans les voies respiratoires.
Altérations du milieu respiratoire.
Troubles des échanges respiratoires.
Troubles produits par les gaz en dehors des voies aériennes.
Emploi thérapeutique des gaz.

Échanges hydriques.

Rôle et répartition de l'eau dans l'organisme. — Circulation de l'eau.
Troubles des apports hydriques, de l'élimination de l'eau, de la circulation et de la fixation de l'eau.
Polyuries.
Thérapeutique.

Échanges minéraux.

Rôle des éléments minéraux.
Équilibres acido-basique des humeurs.
Équilibre osmotique et colloïdal des humeurs.

Chlorure de sodium.

Le sel dans le monde extérieur. — Le sel dans l'organisme.
Troubles du taux de chloruration, de la masse hydrosaline; hydropisies.
Troubles de la sécrétion dans l'estomac. — Sérums.

Phosphore.

Statique du phosphore, et entrée du phosphore dans l'organisme.
Utilisation des composés phosphorés.
Élimination.
Rétention phosphorée.
Désassimilation, phosphaturie.
Intoxication.

Calcium.

Répartition, excrétion, besoins calciques de l'organisme.
Assimilation, régulation, rôle dans l'organisme.
Dystrophies osseuses. — Rachitisme. — Scorbut. — Ostéomalacie.
Dépôts calcaires, lithiase.
Surcharges et rétentions calciques.

Magnésium.

Répartition dans l'organisme.
Rôle dans l'organisme.
Le magnésium en thérapeutique.

Fer.

Le fer alimentaire. — Digestion, absorption, élimination, utilisation du fer.
L'hémoglobine. — Modifications pathologiques de l'hémoglobine.

Autres substances.

Fluor.
Brome. — Iode.
Soufre, arsenic, silicium, carbone, etc.

Échanges hydrocarbonés.

Cycle du carbone. — Propriétés des hydrates de carbone.
Le glycose dans les humeurs. — Glycémie.
Utilisation des hydrates de carbone. — Diabète pancréatique. — Insuline.
Troubles : Glycosurie, Diabète rénal. — Hypoglycémie et hyperglycémie.
Troubles d'utilisation des sucres. Diabète. — Thérapeutique.

Échanges des corps gras et lipoides.

Graisses. — Origine. — Digestion, absorption, utilisation,
Troubles de digestion et d'utilisation, obésité, maigreur.
Lipoides : Caractères. Modifications pathologiques. Cholestérine. Rôle des lipoides.

Échanges des protéines et leurs dérivés.

Cycle de l'azote.
Les albumines.
Modifications pathologiques.
Troubles d'assimilation.
Albuminurie.

Protéides, protéoses et peptones.

Acides aminés.

Propriétés. — Utilisations.
Cystonurie. — Alcaptonurie. — Pigments mélaniques.

Corps cétoniques.

Acido-cétose. — Acétonémie.

Urée.

Troubles de l'élimination. — Rétention. — Maladies des reins, cardianthies. Hyperazotémie.

Acide urique.

La goutte. Thérapeutique.

Acide hippurique.

Acide oxalique.

Corps créatiniques.

Autres déchets azotés.

R. LERICHE

et

A. POLICARD

Professeur de clinique chirurgicale
à la Faculté de Strasbourg.

Professeur d'histologie
à la Faculté de Lyon.

LES PROBLÈMES DE LA PHYSIOLOGIE NORMALE ET PATHOLOGIQUE DE L'OS

Un volume de 230 pages avec 33 figures. 28 fr.

DEPUIS dix ans, les auteurs n'ont cessé d'observer les multiples aspects des évolutions normales et pathologiques de l'os, de réfléchir aux problèmes qu'elles posaient, d'en chercher les solutions diverses de toutes façons, par l'histologie, la radiographie, l'observation et l'expérimentation directe chez l'homme.

Peu à peu s'est imposée à eux une façon nouvelle de comprendre tout ce qui touche au développement, à la vie, aux évolutions, aux maladies, aux régénérations du tissu osseux.

Ce livre est la synthèse de ce travail entièrement original. — MM. Leriche et Policard ont retenu dans les travaux antérieurs seulement ce qui leur paraissait acquis définitivement, en éliminant les hypothèses caduques.

En un mot cet ouvrage de doctrine présente une « théorie » nouvelle confrontée avec les travaux plus anciens.

Cette théorie a un caractère général. Elle s'applique à toutes les modalités de l'ostéogénèse. Elle permet d'en comprendre les diverses particularités, elle explique des faits pathologiques disparates et obscurs, se plaçant toujours au point de vue des tissus considérés en eux-mêmes, d'une façon concrète.

Résumé de la Table :

Signification générale du tissu osseux et marche générale de l'ossification. — Phénomènes conjonctifs préparatoires de l'ossification, rôle des cellules. — Durcissement calcaire de la substance préosseuse. — La résorption osseuse. — Maintien et adaptation fonctionnelle du tissu osseux. — Le périoste. — La réparation des fractures. — Les transplantations osseuses. — Les ossifications hétérotopiques. — Application à l'ossification des lois générales de l'ossification. — Principes physiologiques directeurs de la physiologie osseuse.

Noël FIESSINGER et Henry WALTER

L'EXPLORATION FONCTIONNELLE DU FOIE

ET L'INSUFFISANCE HEPATIQUE

Un volume de 388 pages avec 5 figures. 30 fr.

DANS ces dernières années, l'exploration fonctionnelle du foie a attiré tout particulièrement l'attention des cliniciens et des chercheurs. De nombreuses techniques ont été proposées et si certaines sont sans valeur, d'autres peuvent prendre place dans un examen fonctionnel. Les auteurs qui, depuis plusieurs années, se sont attachés à cette étude, font une mise au point complète et précise de l'exploration fonctionnelle du foie. Après avoir critiqué les méthodes, ils montrent que, dans l'insuffisance hépatique légère ou moyenne, il y a souvent asynergie fonctionnelle, ce qui nécessite l'exploration pluri-fonctionnelle, et que le phénomène de l'intermittence dont on doit la connaissance au Professeur Chauffard nécessite de la même façon la répétition des épreuves.

Dans un chapitre clinique, les auteurs font une étude complète des différentes formes de l'insuffisance hépatique, de leur diagnostic, de leur pronostic et de leur traitement.

De ce livre documenté découle une idée dominante : la fragilité des méthodes expérimentales d'exploration si on la compare à la fermeté des syndromes cliniques. « L'étude fonctionnelle du foie pathologique reste le triomphe de la clinique, mais d'une clinique bien comprise, bien observée et dégagée de cette hâte superficielle qui, pour voir vite, examine mal ».

L'OXYDE DE CARBONE

ET L'INTOXICATION OXYCARBONIQUE

ÉTUDE CHIMICO-BIOLOGIQUE

Par le D^r Maurice NICLOUX

Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.

Membre correspondant de l'Académie de Médecine.

Un volume de 254 pages avec 34 figures. 22 fr.

L'ÉTUDE de ce gaz toxique n'a donné de résultats complets que récemment ; mais le bilan de ces études est maintenant à jour.

La combinaison de l'hémoglobine avec l'oxyde de carbone, le partage du pigment mis au contact du mélange des deux gaz oxygène et oxyde de carbone, sont les deux questions essentielles étudiées dans l'ouvrage.

L'auteur a résumé également nos connaissances sur les sources de la formation de l'oxyde de carbone et les propriétés physiques et chimiques de celui-ci.

Il étudie enfin la pathologie et le traitement de l'intoxication, ainsi que les techniques employées pour les dosages.

LA TRANSFUSION

DU SANG

ÉTUDE BIOLOGIQUE ET CLINIQUE

PAR

P.-Emile WEILL

Médecin de l'Hôpital Tenon.

et

Paul ISCH-WALL

Ancien interne des Hôpitaux de Paris.

Un volume de 248 pages avec 18 figures. 20 fr.

LA transfusion est aujourd'hui considérée comme une intervention inoffensive dont les bénéfices sont immenses.

Cet ouvrage traite en particulier les questions suivantes : Historique ; — biologie de la transfusion ; — le sang citraté ; — accidents ; — moyens d'éviter les accidents ; — technique ; — indications chirurgicales ; — indications obstétricales ; — indications médicales ; — la transfusion du sang dans les infections.

CLINIQUE MÉDICALE DE L'HOPITAL BEAUJON

2^e SÉRIE

Par Ch. ACHARD

Professeur de clinique médicale à la Faculté de Médecine de Paris.

Un volume de 338 pages avec 63 figures. 24 fr.

Les questions traitées dans cette deuxième série sont les suivantes :
L Maladie de Morvan. — Syringomyélie, étude clinique, lésions et pathogénie. — La goutte, étude clinique, lésions et pathogénie. — Traitement de la goutte. — Les gangrènes des diabétiques. — Coma diabétique, étude clinique, pathogénie, traitement. — Diabète hydrurique. — Le danger social de l'alcoolisme. — Paralyse alcoolique. — Cirrhose de Laënnec, étude clinique, lésions et pathogénie. — Régime déchloruré dans le traitement de l'ascite cirrhotique. — Empoisonnement par le sublimé. — Néphrite saturnique. — Urémie hyperazotémique. — Étude clinique. — Étude pathogénique, etc.

L'ŒDÈME

ÉTUDE EXPÉRIMENTALE ET CLINIQUE

Par J. LE CALVÉ

Un volume de 648 pages. 36 fr.

L'ŒDÈME n'a jamais fait l'objet d'un ouvrage aussi complet.
La première partie est expérimentale, l'auteur y discute toutes les théories émises.
La deuxième partie, entièrement clinique, renferme une étude complète des cas qui peuvent se présenter (œdèmes héréditaires, œdèmes des maladies générales et infectieuses). Dans la troisième partie, l'auteur étudie l'œdème dans les maladies des organes ou appareils. — La quatrième partie est consacrée aux œdèmes gravidiques et infantiles.

OPOTHÉRAPIE ENDOCRINIENNE

LES BASES PHYSIOLOGIQUES.
LES SYNDROMES. LA POSOLOGIE DE L'OPOTHÉRAPIE
PAR LES GLANDES A SÉCRÉTIONS INTERNES

Par le D^r Guy LAROCHE
Médecin des Hôpitaux de Paris.

Un volume in-8° de 256 pages avec 17 figures. 14 fr.

Les glandes à sécrétion interne ont une influence considérable sur l'organisme, stimulent ou dépriment les fonctions cellulaires, agissent sur la croissance, sur la nutrition, sur le système nerveux, et surtout sur le système neuro-végétatif. Le médecin doit les utiliser en thérapeutique.

L'auteur consacre un chapitre à la fabrication des produits opothérapiques et à la posologie générale. Puis, pour chacune des glandes il indique leur action physiologique, syndromes cliniques, la thérapeutique. Un chapitre entier est consacré à l'Insuline.

FORMULAIRE D'OPOTHÉRAPIE CLINIQUE

ORGANOTHÉRAPIE

Par le D^r Marcel LAEMMER

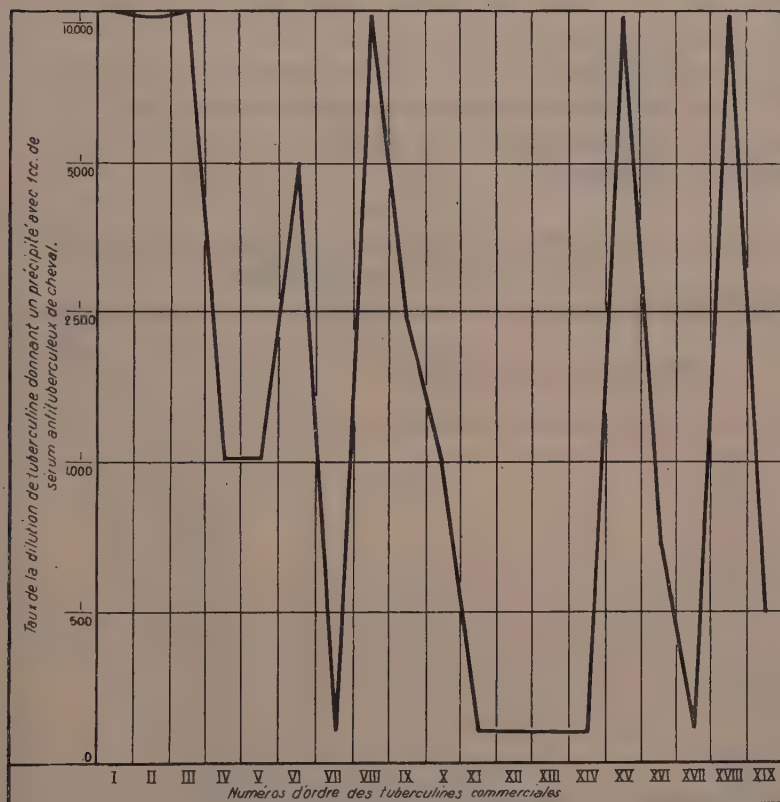
Un volume de 146 pages. 10 fr.

BIEN que l'emploi de l'opothérapie tende à se généraliser en thérapeutique, l'opothérapie vraie est relativement peu employée. L'opothérapie conseillée au hasard, sans raison bien nette, est trop souvent mal formulée ou ordonnée mal à propos.

Ce formulaire d'organothérapie clinique permet au médecin de choisir l'agent médicamenteux d'après les cas variés qu'il rencontre, de le doser, d'utiliser tel produit frais parce que plus actif, tel autre desséché, tel autre seulement par injection. On trouvera dans ce petit volume des conseils et des formules.

à des taux variables : 1/100, 1/500, 1/1.000, 1/2.500, 1/5.000 et 1/10.000.

Après mélange des liquides, on immergeait les tubes dans un



les tuberculines II et III contiennent de l'acide phénique (0,5%)

COURBE IV. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par la méthode de précipitation.

bain-marie à 38° et la lecture de la réaction était faite après trois, cinq et huit heures.

Nous avons constaté que certaines tuberculines achevaient de flocculer en trois heures; d'autres seulement en huit heures; aucune au delà de ce délai.

Les contrôles effectués en diluant le sérum précipitant seul dans l'eau physiologique, ou en additionnant les dilutions de

tuberculines de sérum normal de cheval, sont toujours restés négatifs.

Sur les 19 tuberculines titrées par cette méthode, 6 — dont notre tuberculine-étalon de l'Institut Pasteur, — ont floculé en dilution à 1/10.000. Six autres n'ont fourni de floculat qu'en dilution à 1 p. 100.

Pour différencier les tuberculines floculant au même taux de dilution, nous avons fait suivre les chiffres des signes +, ++ ou +++ suivant l'intensité apparente du précipité. (Voir tableau V et courbe IV.)

TABLEAU V. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par la méthode de floculation.

NUMÉROS D'ORDRE DES TUBERCULINES	TAUX de la dilution de tuberculine donnant un précipité avec 1 cent. cube de sérum
I	1/10 000 +++ (b)
II (a)	1/10.000 +
III (a)	1/10.000 +++
IV	1/1.000 ++
V	1/1.000 ++
VI	1/5.000 +
VII	1/100 ++
VIII	1/10 000 +
IX	1/2.500 +
X	1/1.000 +
XI	1/100 ++
XII	1/100 +
XIII	1/100 ++
XIV	1/100 +
XV	1/10.000 +
XVI	1/1.000 +++
XVII	1/100 ++
XVIII	1/10.000 ++
XIX	1/500 +

(a) Tuberculines contenant 0,5 % d'acide phénique,
 (b) Les signes (+) (++) (+++) indiquent les différences de l'intensité du précipité.

3° MÉTHODE DE TITRAGE PAR CUTI-RÉACTION CHEZ L'HOMME TUBERCULEUX.

Ces expériences ont été effectuées dans le service de M. le professeur Léon Bernard à l'Hôpital Laënnec.

Des scarifications de 4 à 5 millimètres de longueur, distantes

les unes des autres de 25 millimètres au moins, furent faites sur la région externe du bras ou sur la face externe de la cuisse, les 3 supérieures servant toujours pour la tuberculine-étalon, les 3 autres pour la tuberculine à titrer.

Chaque échantillon était dilué dans l'eau glycinée à 50 p. 100 pour obtenir un liquide de viscosité sensiblement analogue à celle des produits bruts. On employait ensuite soit la solution pure, soit des dilutions à 1/10, 1/100 et 1/500.

Chaque tuberculine fut titrée sur quatre malades au moins et, dans les cas où les réactions étaient négatives, les épreuves furent renouvelées avec la solution pure.

La lecture des réactions était faite après vingt-quatre et quarante-huit heures. Dans quelques rares cas la réaction, apparemment négative après quarante-huit heures, ne devint nette que le troisième ou le quatrième jour.

Le caractère de la réaction fut noté par les signes suivants :

- +++ réaction très forte ;
- ++ réaction forte ;
- + réaction faible, mais nette ;
- ± rougeur ;
- 0 négative.

Comme les tuberculines humaines ou bovines sont habituellement employées, pour les réactions cutanées, à l'état pur, ou diluées à 1/10, on peut établir dans une certaine mesure leur valeur respective en se basant seulement sur les résultats obtenus comparativement avec la solution pure et avec la solution au 1/10. C'est ainsi que les tuberculines II, IV, VIII, IX, X et XVIII doivent être considérées comme très bonnes et possédant une activité analogue à celle de l'étalon I.

La valeur de la tuberculine V et surtout de la tuberculine VI est un peu faible, mais encore satisfaisante.

Par contre, les tuberculines III, XI, XIII, XIV, XVII et XIX n'ont aucune valeur pratique pour la cuti-réaction chez l'homme. On peut en dire autant des tuberculines XII, XV et XVI qui, même employées pures, ne donnent qu'irrégulièrement des réactions positives.

La tuberculine VII (précipitée) diluée à 1/10 donne des résultats équivalents à ceux fournis par la tuberculine I (étalon).

TABLEAU VI. — Résultats des cuti-réactions
pratiquées chez des sujets tuberculeux
avec les tuberculines commerciales.

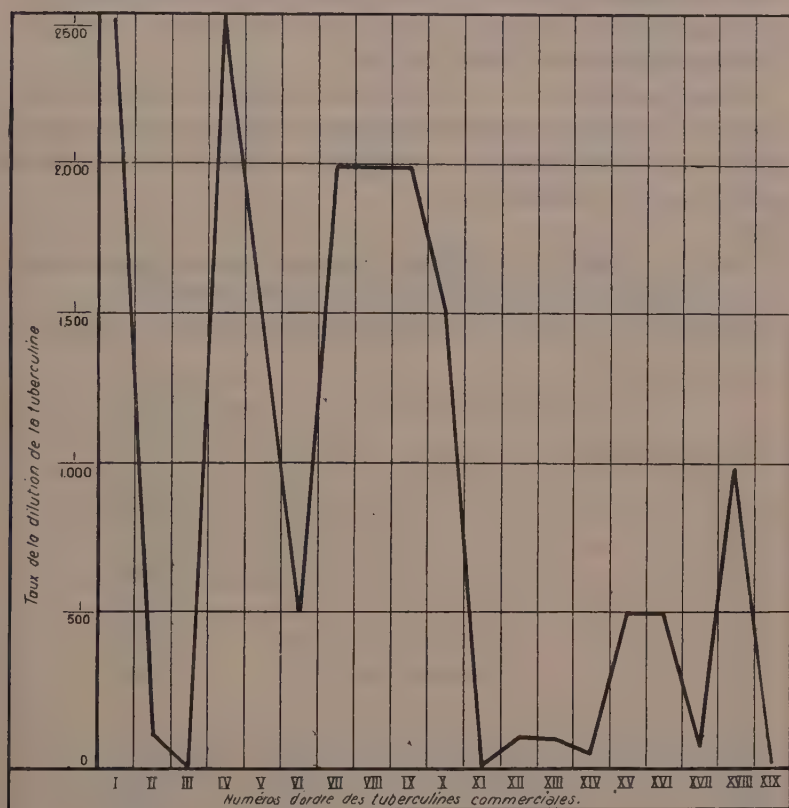
Tuberculine-étalon n° I.				Tuberculine humaine n° II.			
Pure	1/10	1/100	1/500	Pure	1/10	1/100	1/500
+	0	0	0	+	0	0	0
+	0	0	0	+	0	0	0
++	+	+	0	++	+	0	0
+++	++	0	0	+++	++	0	0
+	+	0	0	+	0	0	0
+	—	—	—	+	—	—	—
				<i>Tuberculine sans albumine n° III.</i>			
—	++	+	0	—	0	0	0
—	++	0	0	—	0	0	0
—	0	0	0	—	0	0	0
—	++	+	0	—	0	0	0
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	+	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
				<i>Tuberculine humaine n° IV.</i>			
++	+	0	—	0	0	0	—
±	0	0	—	±	0	0	—
+++	++	+	—	++	+	0	—
±	0	0	—	±	0	0	—
++	0	0	—	++	0	0	—
+	0	0	—	+	0	0	—
+	0	—	—	+	0	—	—
+	0	0	—	+	0	0	—
+	0	0	—	+	0	0	—
				<i>Tuberculine bovine n° V.</i>			
++	++	0	—	++	0	0	—
+++	++	+	—	++	++	0	—
+	0	0	—	+	0	0	—
+++	++	0	—	++	+	0	—
				<i>Tuberculine sans albumine n° VI.</i>			
++	+	0	—	±	0	0	—
+++	++	+	—	+	0	0	—
+++	+++	++	—	+++	+	0	—
+	+	0	—	+	0	0	—
				<i>Tuberculine précipitée n° VII.</i>			
++	+	0	—	—	±	0	—
±	0	0	—	—	0	0	—
+	+	0	—	—	+	0	—
0	0	0	—	—	0	0	—
++	+	0	—	—	+	0	—
++	++	+	—	—	+	0	—

Tuberculine-étalon n° I.				Tuberculine humaine n° VIII.			
Pure	1/10	1/100	1/500	Pure	1/10	1/100	1/500
++	+	+	0	++	+	+	+
±	0	0	0	±	0	0	0
+++	++	+	0	+++	++	0	0
—	0	0	—	—	0	0	—
—	—	+	0	—	—	+	0
—	++	0	0	—	0	0	0
+	—	—	—	+	—	—	—
++	+	±	—	+	±	0	—
++	++	+	—	++	+	0	—
				Tuberculine bovine n° IX.			
—	++	0	0	—	++	0	0
—	++	0	0	—	++	0	0
—	++	++	0	—	++	0	0
—	++	0	0	—	++	0	0
				Tuberculine bovine n° X.			
++++	++++	++	—	++++	++++	0	—
++++	++++	+	—	++++	++++	+	—
++++	++++	0	—	++	±	0	—
++++	++	+	—	++	+	0	—
+	0	0	—	+	0	0	—
				Tuberculine humaine n° XI.			
++	+	0	—	0	0	0	—
++	+	0	—	0	0	0	—
+	0	—	—	0	0	—	—
+	0	—	—	±	0	—	—
+	0	—	—	0	0	—	—
+	0	—	—	±	0	—	—
				Tuberculine humaine n° XII.			
++++	++	+	—	+	0	0	—
++++	++	0	—	0	0	0	—
0	0	0	—	0	0	0	—
++	+	0	—	0	0	0	—
++	+	+	—	0	—	—	—
				Tuberculine humaine n° XIII.			
+	0	0	—	0	0	0	—
++	+	+	—	0	0	0	—
++	+	0	—	0	0	0	—
++	+	0	—	±	0	0	—
++	0	0	—	0	0	0	—
+	—	—	—	0	—	—	—
+	—	—	—	0	—	—	—
+	—	—	—	0	—	—	—
+	—	—	—	0	—	—	—

Tuberculine-étalon n° I.				Tuberculine humaine n° XIV.			
Pure	1/10	1/100	1/500	Pure	1/10	1/100	1/500
+	0	0	—	0	0	0	—
0	0	0	—	0	0	0	—
++	+	0	—	0	0	0	—
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	0	—	—	—
				Tuberculine humaine n° XV.			
+	0	0	—	0	0	0	—
+	+	0	—	0	0	0	—
+++	+++	+	—	±	0	0	—
+	0	0	—	0	0	0	—
+	0	0	—	0	0	0	—
+++	+	0	—	+	0	0	—
+++	+++	+	—	+	0	0	—
+++	+	0	—	0	0	0	—
				Tuberculine bovine n° XVI.			
±	0	0	—	0	0	0	—
+	±	0	—	0	0	0	—
0	0	0	—	0	0	0	—
+	+	0	—	+	0	0	—
+	0	0	—	+	0	0	—
				Tuberculine aviaire n° XVII.			
±	0	0	—	0	0	0	—
+	0	0	—	0	0	0	—
+++	0	0	—	0	0	0	—
+++	+	0	—	0	0	0	—
				Tuberculine mixte n° XVIII.			
++	+	0	0	++	+	0	0
+	±	0	0	+	±	0	0
+++	+++	+	0	+++	+	0	0
+++	+	0	0	+++	0	0	0
0	—	—	—	0	—	—	—
++	—	—	—	++	—	—	—
				Tuberculine aviaire n° XIX.			
—	+++	+	0	—	0	0	0
++	0	0	—	0	0	0	—
+	0	0	—	0	0	0	—
—	+++	0	0	—	0	0	0
—	+++	+	0	—	0	0	0

4^o MÉTHODE DE TITRAGE PAR INTRADERMO-RÉACTIONS
SUR LE COBAYE SENSIBILISÉ.

Le titrage des tuberculines par ce procédé a été effectué sur des cobayes tuberculisés par injection sous-cutanée de



COURBE V. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par intradermo-réactions sur le cobaye sensibilisé.

0 milligr. 01 de bacilles tuberculeux bovins très virulents (souche bovine Vallée). Cinq semaines après l'infection, la sensibilité des animaux fut recherchée par l'injection intradermique de quelques dilutions de tuberculine étalon. Cet essai préliminaire jugé satisfaisant, nous avons procédé au titrage

de l'activité des divers échantillons de tuberculine. A cet effet, les animaux reçurent en injection intradermique 0 c. c. 1 de tuberculine diluée du 1/10 au 1/2.500. Les solutions de tuberculine-étalon furent de 1/1.000, 1/1.500, 1/2.000, 1/2.500. En nous basant sur les données fournies par la cuti-réaction chez les sujets tuberculeux, nous avons eu recours, pour les échantillons qui s'étaient montrés peu actifs par cette méthode, aux dilutions faibles 1/10, 1/100, 1/500; et pour les autres aux dilutions fortes de 1/1.000 à 1/2.500.

Après vingt-quatre heures et quarante-huit heures, la lecture des réactions intracutanées fut faite et nous donnons au tableau VII la moyenne des chiffres obtenus chez les divers animaux. (Voir aussi courbe V.)

TABLEAU VII. — Résultats du titrage des tuberculines commerciales par intradermo-réactions sur le cobaye sensibilisé.

NUMÉROS D'ORDRE DES TUBERCULINES	TAUX de la dilution maximum de tuberculine provoquant une réaction intradermique
I	1/2 500
II	1/100
III	1/10
IV	1/2.500
V	1/1.500
VI	1/500
VII	1/2.000
VIII	1/2.000
IX	1/2.000
X	1/1.000
XI	0
XII	1/100
XIII	1/100
XIV	1/10
XV	1/500
XVI	1/500
XVII	1/100
XVIII	1/1.000
XIX	1/10

Une tuberculine (tuberculine n° IV) s'est montrée aussi active que l'étalon, et trois autres (tuberculines nos VII, VIII et IX) possédaient une activité très voisine de celui-ci. Un seul échantillon (tuberculine n° XI) n'a pas donné de réaction à la dilution au 1/10. Pour trois tuberculines (III, XIV et XIX), la

réaction n'a pas dépassé la dilution au 1/10, et pour quatre autres (tuberculines II, XII, XIII et XVII), la dilution au 1/100.

La comparaison de la valeur des tuberculines, appréciée par la cuti-réaction chez les sujets tuberculeux et l'intradermo-réaction chez le cobaye, montre que les résultats sont assez concordants, surtout pour celles qui sont les moins actives. Parmi les tuberculines qui, par cuti-réaction, avaient été jugées inefficaces, sept sur neuf n'ont provoqué de réactions intradermiques qu'avec des dilutions ne dépassant pas le 1/100. Le taux de la dilution maximum active des deux autres était de 1/500.

Les tuberculines V et VI, dont l'activité cutanée était suffisante, ont donné des réactions intradermiques au 1/1.500 et au 1/500. Quant aux échantillons de valeur analogue en cuti-réaction à celle de l'étalon, leur activité réactionnelle variait de 1/1.000 au 1/2.500. Nous notons toutefois une exception : la tuberculine n° II, dont la valeur avait été jugée égale à celle de l'étalon par cuti-réaction et qui s'est montrée peu active par injection intradermique. La dose réactionnelle de cette tuberculine n'a pas dépassé la dilution au 1/100.

Nous tenons à faire remarquer qu'il est important, pour le titrage par cette méthode, de posséder des cobayes adultes bien résistants, pesant de 450 grammes à 600 grammes, à peau blanche, sinon les caractères de la réaction locale peuvent être atténués et d'interprétation douteuse.

Conclusions.

L'étude comparative que nous avons pu faire des diverses méthodes qu'en l'état actuel de nos connaissances il est possible d'utiliser pour le titrage des tuberculines nous conduit à proposer au Comité d'Hygiène de la Société des Nations les conclusions suivantes :

1° Le procédé de titrage par la réaction de fixation du complément ne permet pas de mesurer la toxicité des tuberculines. Il expose à de multiples causes d'erreurs résultant :

a) De ce que les milieux de culture (sauf certains milieux synthétiques, tels que celui de Sauton) ont par eux-mêmes des propriétés antigènes plus ou moins marquées et très variables;

b) Du fait que certains bacilles paratuberculeux (fléole par exemple) peuvent produire des substances dont le pouvoir antigène *in vitro* est comparable à celui de la tuberculine brute, alors que les paratuberculines sont dépourvues de toxicité pour les animaux tuberculeux.

2° Le procédé de titrage par la réaction de floculation pourrait s'appliquer à la plupart des tuberculines, mais à la condition expresse de disposer d'un *sérum précipitant étalon*. Or un tel sérum, ayant un pouvoir floculant assez élevé, est très difficile à obtenir.

D'autre part, cette réaction n'a aucun caractère de spécificité et elle ne traduit en aucune manière la neutralisation de la tuberculine par l'anti-sérum.

3° La méthode initiale de Robert Koch (modifiée par Otto et par d'autres expérimentateurs) de mesure *in vivo* de la toxicité des tuberculines par la détermination de la dose mortelle en vingt-quatre heures pour le cobaye tuberculeux, donne des résultats approximatifs sur l'une des propriétés des tuberculines (*pouvoir toxique pour l'animal tuberculeux*). Elle ne tient aucun compte du *pouvoir antigène*. Elle nécessite le sacrifice d'un grand nombre de cobayes pour le titrage d'une même tuberculine comparativement avec une tuberculine-étalon qu'il est indispensable de posséder. Elle est, de ce fait, très coûteuse et peu pratique.

4° Les cuti-réactions en séries parallèles, chez *l'homme tuberculeux*, permettent d'évaluer comparativement la valeur diagnostique des diverses tuberculines ou les effets de diverses dilutions d'une même tuberculine sur un seul ou sur plusieurs malades. Mais les résultats qu'elles fournissent manquent de précision parce qu'une partie seulement de la tuberculine introduite dans les scarifications est absorbée. En outre, elles nécessitent des incisions épidermiques multiples que les malades acceptent difficilement, et il n'est pas sûr qu'elles soient inoffensives. On ne peut donc les utiliser que dans des circonstances exceptionnelles.

5° *L'inoculation intradermique*, pratiquée en séries parallèles chez le même animal préalablement sensibilisé (cobaye ou bovin tuberculeux), fournit les résultats de beaucoup les plus satisfaisants. Elle permet de mesurer sur le même sujet

l'activité (pouvoir toxique et pouvoir antigène) de plusieurs tuberculines comparées à une tuberculine choisie comme étalon. Elle est incontestablement spécifique puisque ni les paratuberculines, ni la malléine, ni les bouillons glycélinés ne déterminent de réactions comparables à celles que produisent les tuberculines, et puisqu'elle est inoffensive pour les sujets sains.

Elle ne nécessite qu'une faible dépense d'animaux et les risques d'erreurs provenant de l'inégale sensibilisation de ceux-ci sont réduits au minimum par l'utilisation d'un même animal pour plusieurs tuberculines.

Elle donne des indications plus précises que les autres méthodes, plus faciles à interpréter, plus rapidement obtenues.

Il importe toutefois d'observer qu'elle ne permet pas de déterminer la valeur absolue d'une tuberculine (toxicité et pouvoir antigène) vis-à-vis des différentes espèces animales sensibles. Elle ne vaut que pour l'espèce animale soumise à l'épreuve, de sorte qu'une tuberculine titrée, par exemple, sur le cobaye tuberculeux, peut manifester une activité toxique ou un pouvoir antigène différents pour le bœuf et pour l'homme.

D'où, pour chaque tuberculine, la nécessité d'un contrôle portant sur des sujets tuberculeux appartenant à l'espèce animale à laquelle l'usage de cette tuberculine est destiné (observations : *Annexe D*).

*
* *

Les faits et observations qui précèdent nous obligent donc à conclure qu'en raison de notre ignorance actuelle de la nature des substances actives qui entrent dans la constitution des tuberculines, il est sans doute prématuré de proposer l'adoption de règles internationales pour la mesure de l'activité de ces produits. Il importe que leur titrage fasse encore l'objet de recherches expérimentales. Toutefois on peut utilement recommander aux divers laboratoires qui préparent des tuberculines commerciales d'en effectuer le contrôle de préférence par le procédé des *réactions intradermiques en séries*, comparativement avec une tuberculine-étalon sur un même animal sensibilisé.

ANNEXE A

QUESTIONNAIRE.

a) *Préparation de la tuberculine brute (vieille tuberculine).*

1. Quelles races de bacilles tuberculeux utilisez-vous?
2. Quelle est la composition du milieu de culture?
3. Quel est le pH initial de votre milieu de culture?
4. Quelle est la durée du séjour de la culture à l'étuve?
5. La culture est-elle tuée avant la filtration :
par la chaleur?
par un autre procédé?
6. Le volume de la culture est-il réduit par évaporation avant ou après la filtration?
7. La filtration s'effectue-t-elle sur :
papier filtre n° marque
bougie n° marque
8. Stérilisez-vous le filtrat ainsi obtenu :
par la chaleur?
par un autre procédé?
9. La tuberculine brute que vous délivrez constitue-t-elle un mélange de diverses tuberculines provenant de races ou de souches bacillaires différentes?
10. Si tel est le cas, quelles sont les proportions de tuberculine de race humaine, bovine ou aviaire contenues dans le mélange?
11. Délivrez-vous une tuberculine diluée?
12. Si tel est le cas, à quelle dilution de la tuberculine brute correspond-elle?
13. Ajoutez-vous aux tuberculines que vous délivrez une substance conservatrice, et, si tel est le cas, quelle est la nature et la proportion de la substance ajoutée?
14. a) Délivrez-vous d'autres préparations que la tuberculine brute de Koch?
b) Pouvez-vous indiquer, au moins sommairement, le mode de fabrication, leurs propriétés et leurs caractères?

- c) Sont-elles destinées au diagnostic des affections bacillaires ou à leur thérapeutique?
- d) Préparez-vous et délivrez-vous des dilutions de tuberculine brute, ou d'autres tuberculines (lesquelles) destinées spécialement aux réactions cutanées ou intradermiques? Sous quelles formes délivrez-vous ces préparations?

b) *Procédé de titrage de la tuberculine brute.*

- 15. Procédez-vous à un titrage régulier de votre tuberculine brute?
- 16. Un titrage est-il rendu obligatoire par la loi?
- 17. Pratiquez-vous le titrage sur le cobaye tuberculeux?
- 18. Quelle est la technique suivie et la race employée pour rendre le cobaye tuberculeux?
- 19. Procédez-vous à une épreuve préliminaire, destinée à montrer si les cobayes sont aptes à servir au titrage définitif?
- 20. Par quelle voie introduisez-vous, chez le cobaye tuberculeux, la tuberculine à titrer?
- 21. Titrez-vous par rapport à une tuberculine-étalon ou appréciez-vous seulement la toxicité de votre tuberculine par son effet sur le cobaye?
- 22. Quel est le laboratoire d'où provient votre tuberculine-étalon?
 - Depuis quand l'employez-vous?
 - Est-elle conservée sous forme liquide ou solide?
 - Est-elle stable?
- 23. Effectuez-vous un titrage préliminaire et un titrage définitif?
- 24. Pratiquez-vous le titrage définitif par un ou plusieurs procédés?
- 25. Titrez-vous la tuberculine *in vitro* et, si tel est le cas, votre procédé de titrage repose-t-il sur le principe :
 - de la déviation du complément?
 - de la précipitation?
 - d'autres réactions biologiques?

26. Titrez-vous la tuberculine à l'état brut ou après dilution?
27. Soumettez-vous la tuberculine à d'autres épreuves qu'à celle de l'évaluation de sa toxicité spécifique?

ANNEXE B

LISTE DES 34 LABORATOIRES AYANT RÉPONDU AU QUESTIONNAIRE.

Allemagne.

1. Behringswerke, Marburg.
2. Meister Lucius und Brünig, Höchst a. M.
3. E. Merck, Darmstadt.
4. Chemische Fabrik Schering, Berlin.

Australie.

5. Commonwealth Serum Laboratories, Melbourne.

Autriche.

6. Staatliches Serotherapeutisches Institut, Vienne.
7. Alpenländische Serum Werke, Graz.

Brésil.

8. Institut Brésilien de Microbiologie, Rio de Janeiro
9. Institut Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Canada.

10. Biological Laboratory, Ottawa.

Chili.

11. Institut d'Hygiène expérimentale, Montevideo.

France.

12. Institut Pasteur, Paris.

Grande-Bretagne.

13. The Lister Institute, Londres.
14. The Wellcome Physiological Laboratories, Beckenham.

- 15. Evans Sons, Lescher et Webb Limited, Higher Runcom (Cheshire).
- 16. MM. Duncan and Flockhard, Londres.

Italie.

- 17. Laboratorio Bruschetti, Gênes.

Japon.

- 18. Institute for infectious diseases, University, Tokio.
- 19. Kitasato Institute for infectious diseases, Tokio.
- 20. Hoshi Pharmacy Co.
- 21. Ishigami Institute.
- 22. Osaka Kessei Yakuin (Serum Pharmacy).

Pays-Bas.

- 23. Rijks serum inrichting, Rotterdam.
- 24. Institut pour maladies parasitaires et infectieuses, Utrecht.
- 25. Institut de Pathologie comparée, Leyde.
- 26. Dr Veenbaas, Leeuwaarden, Service d'Hygiène vétérinaire.

Pologne.

- 27. Professeur Odo Bujwid, Cracovie.

Roumanie.

- 28. Faculté de Médecine, Bucarest.

Suède.

- 29. Laboratoire Bactériologique de l'Etat, Stockholm.
- 30. Institut vétérinaire de l'Etat, Stockholm.

Tchéco-Slovaquie.

- 31. Dr Veleminsky, Prague.
- 32. Laboratoire Médica, Prague.
- 33. Sero-Therapeutic Institut, Ivanovice, Moravie.

Ukraine.

- 34. Institut Sanitaire Bactériologique, Kharkoff.

TABLEAU RÉSUMANT LES RÉPONSES FOURNIES PAR LES LABORATOIRES PRO

LES NOMS des laboratoires correspondant au numéro d'ordre sont mentionnés à l'annexe B	RACES des bacilles utilisés	COMPOSITION du milieu de culture son pH initial	AGE des cultures	MO de stérilisation des cultures
1	4 souches humaines, 2 souches bovines.	1 kilogramme de viande de cheval, 4 kilogrammes d'eau, 3 p. 100 de glycérine, 1 p. 100 de peptone, 0,5 p. 100 de NaCl. $pH = 7,1$ à $7,2$.	3 mois et plus.	Par la chaleur
2	Bacilles humain, bovin et aviaire.	Bouillon glyciné peptoné. pH = pas déterminé.	4 à 5 semaines.	Par la chaleur
3	Bacilles humain et bovin.	Extrait de viande, peptone et glycérine. $pH = 6,6$.	4 à 6 mois.	Par la chaleur
4	Bacille humain.	—	—	—
5	Bacilles humain et bovin.	1 gramme de veau, 1 cent. cube d'eau, 1 p. 100 de peptone, 0,5 p. 100 de NaCl, 5 p. 100 de glycérine. $pH = 7,8$.	6 semaines à 2 mois.	Par la chaleur
6	Bacilles humain, bovin et aviaire.	1 p. 100 de peptone, bouillon, 6 p. 100 de glycérine. $pH = 7,4$.	2 mois.	2 heures de stérilisation à la vapeur.
7	Bacille bovin.	Bouillon de bœuf glyciné à 2,5 p. 100. $pH = 6,4$.	4 à 6 semaines.	Par la chaleur
8	Bacilles humain et bovin.	Bouillon simple, glyciné à 6 p. 100. $pH = ?$	2 mois.	Par la chaleur

SUR LE TITRAGE (STANDARDISATION) DES TUBERCULINES 401

TUBERCULINE SUR LE MODE DE PRÉPARATION DE LA TUBERCULINE BRUTE.

MODES de filtration et de concentration	MODES de conservation des tuberculines concentrées	FORMES sous lesquelles les tuberculines sont délivrées
Concentration avant filtra- tion. Filtration sur pa- per filtre n° 602.	A l'état pur, sans nouveau chauffage. Addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine, bovine et mixte, concentrée ou diluée à 1/10.
Concentration avant filtra- tion. Filtration sur pa- per.	A l'état pur, sans nouveau chauffage. Addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine, Perl- sucht tuberculine, tubercu- line aviaire, concentrées.
Concentration avant filtra- tion. Filtration sur pa- per filtre et bougie.	A l'état pur, sans nouveau chauffage.	Tuberculine humaine con- centrée.
—	—	Ertuban.
Concentration avant filtra- tion. Filtration sur un re Büchner compre- nant 2 couches de papier filtre, 1 couche d'ouate et 2 couches de papier filtre.	A l'état pur, sans nouveau chauffage. Addition d'un mé- lange de 100 parties d'acide phénique et 15 parties d'eau en proportion de 0,5 p. 100 d'acide phénique pur.	Tuberculines humaine et bo- vine concentrées et diluées de 1/10 à 1/100.000.
Concentration, puis filtration sur papier filtre.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur. Addition de 0,5 p. 100 de tricrésol aux tuberculines concentrées.	Tuberculine humaine, bovine et aviaire délivrées sépa- rément à l'état brut. Dilu- tions jusqu'à 1/100.000 de tuberculine humaine pour le traitement.
Concentration, puis filtration sur papier filtre n° A.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine bovine concentrée ou diluée.
Concentration, puis filtration sur bougie Chamber- land.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine humaine et bo- vine concentrée ou diluée au 1/10.

LES NOMS des laboratoires correspondant au numéro d'ordre sont mentionnés à l'annexe B	RACES des bacilles utilisés	COMPOSITION du milieu de culture son pH initial	AGE des cultures	me de stér des c
9	Bacille humain.	Bouillon glycérimé. $pH = 6,5$.	1 mois.	Aucun.
10	Bacille bovin.	Glycérine 5 p. 100, sucre 1 p. 100, sel 0,5 p. 100, peptone 1 p. 100, infu- sion de bœuf ou de veau. $pH = 8$.	10 à 12 semaines.	3 heures clave
11	Bacille humain.	Bouillon de viande de bœuf avec pommes de terre hachées. Macéra- tion 24 heures, filtra- tion, stérilisation. $pH = 7 - 7,2$.	2 mois.	Par la c
12	Bacilles humain et bovin.	Bouillon de veau pepto- nisé glycérimé à 4 p. 100. $pH = 7,6$ à $7,8$.	6 semaines.	Par la ch
13	Bacille bovin.	Bouillon glycérimé à 5 p. 100. Le bouillon est formé d'une diges- tion trypsique de viande de cheval. $pH = 7,8$.	6 à 8 semaines.	Par la c 2 jours cutifs, à 100°
14	Bacilles humain et bovin.	Bouillon de veau glycé- rimé. $pH = 7,5$ à $7,7$	10 à 24 semaines.	Par la ch
15	Bacilles humain et bovin.	Bouillon de veau glycé- rimé. $pH = 7$ à $7,5$.	6 à 10 semaines.	Par cha 1 heure pour l P. T.; et P. T. sont pe avant tion.
16	Bacilles humain et bovin.	Bouillon de veau stan- dard glycérimé à 5 p. 100. $pH = 7,2$ à $7,3$.	5 semaines.	Par la ch

MODES de filtration et de concentration	MODES de conservation des tuberculines concentrées	FORMES sous lesquelles les tuberculines sont délivrées
filtration sur papier, puis sur bougie Chamberland.	A l'état pur, sans nouveau chauffage et addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine mixte humaine et bovine concentrée ou diluée au 1/10.
réduction après filtration sur papier filtre et bougie Mandler.	Chauffage 1 heure à 100° et addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine bovine concentrée ou diluée suivant son activité.
réduction avant filtration sur papier filtre Laurent.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur et additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine concentrée ou diluée au 1/10 et plus.
réduction avant filtration sur papier Chardin.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine mixte, 75 p. 100 de bovine et 25 p. 100 d'humaine concentrée ou diluée au 1/10.
réduction après filtration sur papier filtre.	A l'état pur, sans nouveau chauffage. Addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine concentrée ou diluée en proportions égales avec de l'eau phéniquée à 0,5 p. 100.
réduction après filtration sur pulpe de papier et bougie Berkefeld.	Le filtrat n'est pas stérilisé mais additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine ou bovine concentrée ou diluée au 1/10.
T. et P. T. évaporées au 1/3 du volume initial, filtrées et puis évaporées au 1/10. Filtration sur bougie.	Chauffage à 100° pendant une demi-heure et addition de 0,5 p. 100 d'acide phénique pour T. et P. T. T. O. A. et P. T. O. chauffées à 60-70°.	Tuberculines humaines ou bovines concentrées ou diluées.
réduction après filtration sur papier filtre.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine humaine ou bovine concentrée ou diluée.

LES NOMS des laboratoires correspondant au numéro d'ordre sont mentionnés à l'annexe B	RACES	COMPOSITION	AGE	MODE
	des bacilles utilisés	du milieu de culture son pH initial	des cultures	de stérilisation des cultures
17	Bacille humain.	a) Bouillon de viande glycériné. b) Milieu à l'œuf de Bes- redka. c) Milieu à l'œuf d'après une méthode person- nelle. $pH = ?$	40 à 50 jours.	Par la chaleur pour les tubes en li- on, par la pour les tubes en lieu à l'œuf
18	Bacille humain.	A 500 grammes de viande de bœuf, on ajoute de l'eau pour obtenir 1 litre de bouillon, 10 grammes de peptone, 5 grammes de sel, 40 grammes de glycérine. $pH = 6,8 - 7.$	8 semaines.	Par la chaleur
19	Bacille humain.	Bouillon ordinaire, 4 p. 100 de peptone, 4 p. 100 de glycérine. $pH = 6,8 - 7.$	5 semaines.	Par la chaleur 1 heure à
20	Bacille humain.	Bouillon peptoné glyc- riné à 4 p. 100. $pH = ?$	8 semaines.	Par la chaleur
21	Bacille humain.	Bouillon peptoné à 1 p. 100, glycériné à 3 p. 100. $pH = 7.$	4 semaines.	Par la chaleur
22	Bacille humain.	Bouillon peptoné à 1 p. 100, glycériné à 4 p. 100. $pH = ?$	4 à 8 semaines.	Par la chaleur
23	Bacilles humain, bovin et aviaire.	Bouillon de pomme de terre, glycériné à 5 p. 100. $pH = 6,9.$	8 semaines.	Par la chaleur
24	Bacille bovin.	Bouillon glycériné. $pH = 6.$	6 semaines.	Par la chaleur
25	Bacilles humain, bovin, du porc, du bœuf et aviaire.	Bouillon ordinaire glyc- riné à 2,5 p. 100. $pH = 7,2.$	6 semaines.	Par la chaleur

MODES de filtration et de concentration	MODES de conservation des tuberculines concentrées	FORMES sous lesquelles les tuberculines sont délivrées
réduction après filtration sur papier Chardin pour les cultures en bouillon. Les cultures en milieu à l'œuf ne sont pas concentrées.	Le filtrat des cultures en bouillon est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine humaine concentrée.
réduction avant filtration sur papier.	Le liquide filtré n'est pas stérilisé, mais additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine concentrée.
réduction avant filtration sur toile et papier filtre.	Le liquide filtré n'est pas chauffé, mais on y ajoute 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine concentrée ou diluée du 1/4 au 1/1.000.
réduction après filtration sur papier filtre.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur et additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine concentrée ou diluée de 1/10 à 1/1.000.
réduction après filtration sur papier filtre.	Le filtrat n'est pas stérilisé, mais on y ajoute 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine brute.
concentration avant filtration sur plusieurs couches de papier filtre.	Le filtrat n'est pas stérilisé, mais on y ajoute 0,5 p. 100 d'acide phénique.	Tuberculine humaine concentrée et diluée de 1/10 au 1/1.000 et au delà.
réduction après filtration sur papier filtre et amiant.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine humaine, bovine et aviaire concentrée et diluée au 1/10.
réduction avant filtration sur papier filtre.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine bovine concentrée, réservée seulement pour l'ophtalmo-réaction.
réduction avant filtration sur papier Chardin.	Le filtrat est stérilisé par la chaleur.	Tuberculine concentrée ou diluée suivant les demandes.

LES NOMS des laboratoires correspondant au numéro d'ordre sont mentionnés à l'annexe B	RACES des bacilles utilisés	COMPOSITION du milieu de culture son pH initial	AGE des cultures	Méthode de stérilisation des cultures
25	Bacille bovin.	Eau de pomme de terre, bouillon peptoné à 1 p. 100, NaCl à 0,5 p. 100, gly- cériné à 5 p. 100. $pH = 6$.	6 semaines.	a) par la chaleur b) chauffage à 80° C. pendant plusieurs heures, réduction du volume et filtration
27	Bacille humain.	Bouillon de bœuf, pep- tone 1,5 p. 100, NaCl 0,5 p. 100. $pH = 7,5$.	3 à 4 mois.	Par la chaleur
28	Bacille humain.	Bouillon de bœuf pep- toné et glycérimé à 4 p. 100. $pH = 7,2$	2 à 3 mois.	Par la chaleur
29	Bacille humain.	Bouillon de bœuf, NaCl 3 p. 100, peptone 1 p. 100, glycérine 3 p. 100, NaH ² PO ⁴ 4 p. 100. $pH = 6,7$ à 6,9.	6 à 8 semaines.	Pas de stérilisation des cultures.
30	Bacille bovin.	Bouillon peptoné et gly- cériné ordinaire. $pH =$ acide.	2 mois.	Par la chaleur
31	Bacilles humain et bovin.	Bouillon glycérimé ordi- naire. $pH =$ alcalin.	6 à 18 mois.	Aucune stérilisation.
32	Bacilles humain et bovin.	Bouillon de bœuf glycé- rimé. $pH = 6,8$ à 6,9.	6 semaines.	Par la chaleur
33	Bacilles humain, bovin et équ.	Bouillon ordinaire gly- cériné à 9 p. 100. $pH = 7,2$ à 7,6.	2 à 3 mois.	Par la chaleur
34	Bacilles humain et bovin.	Bouillon peptoné à 1 p. 100 et glycérimé à 3 p. 100. $pH = 6,6$ à 6,9.	2 à 3 mois.	Aucun.

<p>MODES de filtration et de concentration</p>	<p>MODES de conservation des tuberculines concentrées</p>	<p>FORMES sous lesquelles les tuberculines sont délivrées</p>
<p>Action avant filtration sur papier Chardin ou Gleicher.</p>	<p>La tuberculine B n'est pas stérilisée.</p>	<p>Tuberculine bovine concentrée.</p>
<p>Évaporation après sé- dimentation ou filtration sur papier filtre.</p>	<p>Le filtrat est chauffé deux fois à 100° pendant 30 minutes.</p>	<p>Tuberculine humaine con- centrée ou diluée à 1/10.</p>
<p>Action au 1/10 puis décantation après sédi- mentation pendant 45 à 50 jours.</p>	<p>La culture est mise en am- poules après décantation et chauffée à 100° pendant 30 mi- nutes.</p>	<p>Tuberculine humaine con- centrée ou diluée au 1/4 dans la glycérine neutre.</p>
<p>Action après filtration sur bougie Berkefeld.</p>	<p>Le filtrat est chauffé à 60° et additionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.</p>	<p>Tuberculine humaine con- centrée.</p>
<p>Action avant filtration sur papier.</p>	<p>A l'état pur, sans nouveau chauffage ni addition d'anti- septiques.</p>	<p>Tuberculine bovine concentrée.</p>
<p>Action sur papier.</p>	<p>Addition de 1 p. 100 de phénol.</p>	<p>Tuberculomucines humaines et bovines pures non diluées.</p>
<p>Action après filtration sur papier filtre.</p>	<p>Le filtrat est stérilisé par la chaleur et additionné de phénol.</p>	<p>Tuberculine humaine ou bo- vine concentrée.</p>
<p>Action avant filtration sur papier filtre.</p>	<p>Le filtrat est chauffé à 110-120°.</p>	<p>Tuberculine brute polyval- ente (2 parties de tuber- culine humaine, 4 p. de tuberculine bovine et 2 p. de tuberculine équine). Dila- tions au 1/10. Tuberculines réservées à l'usagevétéri- naire.</p>
<p>Action avant filtration sur papier filtre.</p>	<p>Le filtrat est tyndallisé et ad- ditionné de 0,5 p. 100 d'acide phénique.</p>	<p>Tuberculine humaine ou bo- vine concentrée et diluée au 1/4 jusqu'à 1/5.000.</p>

ANNEXE D

OBSERVATIONS DE CAS MONTRANT LES DIFFÉRENCES OBTENUES
PAR LES DIFFÉRENTS PROCÉDÉS.

Tuberculines n^{os} III et X.

Tuberculines n^{os} XV, XVI et XII.

Tuberculines n^{os} XVI, IV, V et X.

Tuberculines n^{os} IX et VI.

TUBERCULINES N^{OS} III ET X. — Elles possèdent le même pouvoir antigène. La première précipite au taux de la dilution 1/10.000 (mais la présence d'acide phénique peut modifier ce résultat et n'a aucune action en cuti et intradermo-réaction). La deuxième précipite à la dilution au 1/1.000; possède en cuti-réaction une activité égale à l'étalon et en intradermo-réaction une activité moyenne.

TUBERCULINES N^{OS} XV, XVI, XII. — La valeur de ces tuberculines, appréciées par la cuti-réaction, est pratiquement nulle et très minime par l'intradermo-réaction. Les n^{os} XV et XII ont une valeur antigène (70) égale et le n^o XVI une valeur double (150). Les taux de la précipito-réaction sont de 1/10.000, 1/1.000 et 1/100.

TUBERCULINES N^{OS} XVI, IV, V ET X. — Ces 4 tuberculines possèdent un pouvoir précipitant égal de 1/1.000. Deux d'entre elles, n^{os} XVI et X, ont une valeur antigène très forte (150 et 200 unités); leur activité en cuti et en intradermo-réaction est, pour l'une très faible, et pour l'autre forte.

Les deux autres tuberculines n^{os} IV et V ont une valeur antigène moyenne (90-70 unités) et leur activité en cuti-réaction est insuffisante pour les considérer comme de très bonnes tuberculines. Toutefois, en intradermo-réaction, la tuberculine IV se montre supérieure à la tuberculine V.

TUBERCULINE N^O IX. — Celle-ci possède une *forte* activité en

MASSON ET C^{IE}, ÉDITEURS
LIBRAIRES DE L'ACADÉMIE DE MÉDECINE
120, BOULEVARD SAINT-GERMAIN, 120 — PARIS — VI^e ARR.
AVRIL 1926

B



NUMÉRO 117

R. G. Paris 15.234

La vente est faite au prix de Catalogue, mais en raison des conditions économiques, les prix énoncés au Catalogue peuvent être modifiés par l'application d'un coefficient de majoration décidé par le Syndicat des Éditeurs.

(Ces conditions de vente en France sont provisoirement applicables à la Belgique.)

DERNIÈRES PUBLICATIONS MÉDICALES



Troubles des Echanges Nutritifs

PHYSIOPATHOLOGIE PATHOLOGIQUE

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

A. MARTINET

Thérapeutique Clinique

AGENTS THÉRAPEUTIQUES — TECHNIQUES THÉRAPEUTIQUES
TRAITEMENT DES SYMPTÔMES — TRAITEMENT DES MALADIES

avec la collaboration des Docteurs

DESFOSSÉS, Georges LAURENS, Léon MEUNIER, M^{me} LABORDE, LOMON, LUTIER, MARTINGAY,
MOUGEOT, POIX, SAINT-CÈNE, SÉGARD et TERSON.

Troisième Édition, revue et complétée par les collaborateurs.

1 volume de 1608 pages avec 348 figures. Broché 100 fr. Cartonné 120 fr.
Relié en deux volumes 130 fr.

Il y a quelques semaines paraissait la 5^e Édition du *Diagnostic clinique*.

Aujourd'hui les collaborateurs du Dr Martinet respectant l'originalité de son œuvre font paraître une troisième édition de la thérapeutique. — Ils ont mis à jour les articles qu'il avait écrits lui-même, et chacun dans leur secteur ils ont fait les remaniements et les additions que la science a nécessités.

sion du sang, pneumothorax, cryothérapie, etc.
Un article a été ajouté sur l'*immunité locale* : vaccins, sérums, etc.

La thérapeutique symptomatique s'est enrichie du traitement de la céphalée, de la migraine, des vertiges.
Les *traitements des maladies digestives, des maladies respiratoires* ont été révisés.

Parmi les chapitres importants ajoutés : les *traitements du diabète par l'insuline*, les *traitements par le Radium*.

MASSON ET C^{ie}, ÉDITEURS

P. LECÈNE

Professeur à la Faculté de Médecine de Paris.

R. LERICHE

Professeur à la Faculté de Médecine de Strasbourg.

Thérapeutique Chirurgicale

Tome III. — (Vient de Paraître) **Abdomen et Organes Génito-Urinaires**, par P. LECÈNE.

Un volume de 646 pages.

Broché. 50 fr. Cartonné toile. 60 fr.

Tome I. — **Généralités, Membres**, par R. LERICHE. (*Paraîtra en Mai 1926*).

Tome II. — **Tête, Bouche, Cou. Thorax, Glandes Mammaires**, par P. LECÈNE.

Rachis, Bassin, par R. LERICHE. **Nez, Oreilles, Larynx**, par F. LEMAITRE, professeur agrégé à la Faculté de Médecine. (*Paraîtra en Mai 1926*).

Cet ouvrage de conception entièrement nouvelle comprend trois parties essentielles :

1^o Les indications du traitement chirurgical.

2^o La réalisation de ces indications.

3^o Les résultats que donne l'acte chirurgical exé-

cuté, et « d'ordre purement intellectuel » ainsi que les résultats sont étudiés avec développement.

Les indications thérapeutiques que l'on peut appeler *médico chirurgicales* et qui forment le domaine frontière entre la médecine et la chirurgie, reviennent dans ces

Précis de Technique Opératoire

Par les Prosecteurs de la Faculté de Médecine de Paris

OUVRAGE COMPLET DANS LA Nouvelle Série

7 volumes petit in-8 avec de nombreuses figures.

Chirurgie de [] [] [] par **M. Guibé et Jean Quénu.**
[] [] [] **L'Abdomen**
[] [] [] **6^e Edition**
[] [] [] avec 366 figures. Broché. 20 fr.
[] [] [] Cartonné toile 25 fr.

La Nouvelle Série du « *Précis de technique opératoire* » des prosecteurs de la Faculté de médecine de Paris est complète avec ce dernier volume : *Chirurgie de l'abdomen*. — Les sept volumes de cette collection conservant rigoureusement le même aspect que dans les précédentes éditions ont été rédigés dans le même esprit pratique. Ils ont été entièrement revus et le plus souvent réécrits par les auteurs et leurs continuateurs et élèves, les jeunes prosecteurs de la Faculté de Paris. Les techniques ont été remaniées, adaptées aux idées actuellement courantes, l'illustration a été entièrement refaite.

Dans ce dernier volume consacré à la *Chirurgie de l'Abdomen*, les auteurs n'ont conservé que la valeur d'une douzaine de pages de l'ancien texte. 43 figures anciennes seules ont été maintenues auxquelles 323 figures nouvelles ont été ajoutées presque toutes originales.

Des chapitres concernant des opérations périmées ou devenues rares ont été supprimés.

Un certain nombre de chapitres nouveaux concernant des opérations nouvelles devenues plus fréquentes ont été ajoutés : *Laparotomies élargies, Thoraco-laparotomies, Pylorotomie longitudinale extra-muqueuse, Gastro-et Pyloroplasties, Gastro-gastrostomie, Occlusion du pylore, Duodéno-jéjunostomie, Typhlopésie, Colopexie droite, Nécro- et Typhlo-sigmoïdostomie, Cerclage de l'anus.*

Pour chaque intervention, les auteurs donnent une description du procédé choisi; ils expliquent l'acte opératoire et la possibilité de l'exécuter rapidement. L'illustration abondante représente les positions, les temps opératoires, les détails anatomiques, etc.

Pratique courante et Chirurgie d'urgence, par V. VEAU et d'ALLAINES. (7^e Edition).
Chirurgie de l'Appareil génital de la Femme, par R. PROUST et J. CHARRIER. (6^e Edition).
Chirurgie du Membre inférieur, par P. LABEY et Jacques LEVEUF. (5^e Edition).
Chirurgie de la Tête et du Cou, par Ch. LENORMANT et F. BROcq. (6^e Edition).

Chacun de ces six volumes. Broché, 15 fr. Cartonné toile, 20 fr.

Manuel de Techniques,

par **Léonor**

Michaelis. Tra-

de Physico-Chimie

et

spécialement de Chimie

des Colloïdes

à l'usage des Médecins

et des Biologistes

avec 40 figures 14 fr.

Ce livre est une introduction à l'étude de la physico-chimie.

Ce n'est pas un livre de technique au sens propre du mot mais un choix d'exercices, de manipulations, qui se recommandent par leur valeur très instructive. Ils portent sur : le *seuil de floculation des solutions colloïdales*. — *La mesure des ions-hydrogène à l'aide des indicateurs*. — *La Tension superficielle*. — *La Diffusion, l'Osmose, la Filtration*. — *Le Gonflement, la Viscosité, la Formation du Gel*. — *L'influence de la concentration en ions-hydrogène sur l'activité des ferments, etc., etc.*

Anatomie

par **P. Bellocq,**

chargé de cours à la

Médico - Chirurgicale

Faculté de Stras-

bourg, 1^{er} vol. de

Fascicule II.- La Face

68 pages avec

46 figures. 22 fr.

Le premier fascicule de cette anatomie publié récemment était consacré au crâne. Ce nouveau fascicule a été établi sur ce même plan.

Introduction à l'Étude de la

Psychogénèse

par le Dr **M. Dide,**

directeur-médecin

des Asiles d'Aliénés,

1 volume de 224 pa-

ges 12 fr.

Essai de Bio-Psychologie Évolutive

Ouvrage de philosophie scientifique et médicale, riche de faits et de synthèses audacieuses et suggestives.

le chirurgien de carrière et se contentent d'exposer les idées générales qui guident le chirurgien dans l'exécution d'une opération, le but précis qu'il se propose et les procédés variés qu'il peut employer pour le réaliser.

Les discussions et les indications, actes essentiels

Leçons de Pathologie Digestive

6^e Série

par **M. Loeper**,
professeur agrégé à
la Faculté de Méde-
cine de Paris, méde-
cin de l'Hôpital Te-
non. 1 vol. de 274 pages avec 47 fig. 22 fr.

On trouvera dans cette série traités les sujets sui-
vants :

L'épreuve de la leucopédiase gastrique — Leucopédiase et intoxication digestive de l'estomac — Leucopédiase et intoxication digestive — L'appréciation radiologique de l'activité sécrétrice de l'estomac par le temps de rupture des capsules opaques — Le diagnostic topographique des ulcères de l'estomac — Les éperons et niches de la petite courbure — L'estomac biloculaire d'origine ulcéreuse — A propos de la syphilis gastrique — Le fonctionnement de la muqueuse gastrique dans le cancer de l'estomac. — Les gastronévroses. — Les généralisations cutanées du cancer de l'estomac. — Les jours de jeûne au cours du traitement des angio-cholecystites crdonomiques — Les indications des cures hydrominérales dans les ulcères de l'estomac, etc., etc.

attentive.

Les opinions indiquées dans ce traité sont celles des auteurs, on y retrouverait l'expérience collective, qui se dégage de la lecture des livres et des mémoires spéciaux et surtout leur vaste expérience personnelle.

Les Problèmes de la Physiologie

Normale et Pathologique

par **R. Leriche**
professeur de clinique chirurgicale à la Faculté de Strasbourg et **A. Policard**,
professeur d'histologie à la Faculté de
Lyon. Un vol. de 230 pages avec 33 fig. 28 fr.

Depuis dix ans, les auteurs n'ont cessé d'observer les multiples aspects des évolutions normales et pathologiques de l'os, de réfléchir aux problèmes qu'elles posent, d'en chercher les solutions diverses de toutes façons, par l'histologie, la radiographie, l'observation et l'expérimentation directe chez l'homme.

Ce livre est la synthèse de ce travail entièrement original. — MM. Leriche et Policard ont retenu dans les travaux antérieurs ce qui leur paraissait acquis définitivement, en éliminant les hypothèses caduques. En un mot, cet ouvrage présente une « théorie » nouvelle, confrontée avec les travaux plus anciens.

**Contribution à l'Étude
des**

Paraplégies Pottiques

Essai sur l'Évolution
et le Pronostic basé sur
40 Observations personnelles.

par M^{me} le Docteur
Sorrel-Déjerine,
ancien interne des
Hôpitaux de Paris,
membre de la Société
Anatomique. 1 vo-
lume de 402 pages
avec 97 fig. **40 fr.**

L'étude des paraplégies pottiques a donné naissance à de nombreux travaux, mais il semble que si leur symptomatologie fut longuement et patiemment étudiée, à aucun moment l'attention ne fut suffisamment attirée vers les formes cliniques, l'évolution et le pronostic. Pourquoi certaines paraplégies guérissent-elles? Pourquoi d'autres restent-elles définitives? Quels sont les signes sur lesquels il serait possible de s'appuyer pour baser un pronostic. Tels sont les points que M^{me} Sorrel-Déjerine traite dans ce livre et pour lesquels elle apporte 40 observations personnelles; — dont quelques-unes avec autopsies — suivies pendant quatre ans dans le service du Docteur Sorrel à l'Hôpital Maritime de Berck (P. de C.).

De l'étude de ces 40 observations, étudiées aussi bien chez des enfants que chez des adultes, l'auteur conclut que la guérison des paraplégies pottiques s'observe avec la même fréquence chez l'adulte que chez l'enfant, et que l'âge n'est pas un facteur de gravité.

La Radiologie

du

Médecin Praticien

Radiodiagnostic des Maladies
de l'Appareil digestif

par **R. Ledoux-
Lebard**. 1 volume
de 288 pages avec
101 fig. et 12 plan-
ches. (*Collection Mé-
decine et Chirurgie
pratiques*). **30 fr.**

L'auteur envisage seulement le radiodiagnostic des maladies de l'appareil digestif. Avant d'en aborder l'étude, il donne des notions sur les Rayons X, sur la technique générale et l'interprétation des images. On trouve ensuite les chapitres suivants :

Technique spéciale de l'examen radiologique du tube digestif. Essai de séméiologie radiologique du tube digestif. Bouche. Pharynx et œsophage. L'estomac. La séméiologie de l'estomac pathologique. Duodénum et intestin grêle. Gros intestin. Le côlon pathologique. Annexes du tube digestif.

Pour chaque organe, les différents modes d'examen et procédés sont indiqués et à propos de chaque affection l'organe est examiné à l'état normal et à l'état pathologique avec ses anomalies réelles ou apparentes, ses aspects, les erreurs dont il peut être l'objet.

Avec cet ouvrage, le médecin saura dans quel cas, il devra provoquer un examen radiologique; il en suivra facilement les différentes phases, et interprétera facilement les images qui lui auront été transmises.

Deux volumes formant ensemble 1220 pages avec 167 figures. 110 fr.

Ce beau livre est le résultat et la synthèse de quinze années d'un patient labeur, et l'on ne sait ce qui doit être le plus admiré des deux rares qualités qu'il unit : le souci d'une documentation exhaustive, la sûreté de jugement dans la construction.

Conçu sur un plan nouveau, écrit d'une seule main (et pour ce motif plus homogène que ces ouvrages qui ne sont que des compilations écrites en collaboration), ce volume groupe une « bibliothèque » de documents sur les innombrables recherches dont la nutrition normale et pathologique a fourni la matière. Il fixe l'état de nos connaissances au premier quart du xxe siècle sur cette partie de la médecine qui comprend tant de questions complexes, discutées, et en perpétuelle évolution. Dans les traités classiques, les descriptions pathologiques des troubles nutritifs ont encore pour base

principale les symptômes dominants dont on s'applique à faire des maladies distinctes. Dans cet ouvrage, conformément à l'évolution de la médecine, c'est la physiologie qui sert de base à leur étude. Les désordres qui surviennent dans les actes élémentaires de la nutrition y sont envisagés non pour définir les maladies, mais pour guider l'interprétation pathogénique des phénomènes morbides observés en clinique. Plutôt qu'une description des maladies de la nutrition, telles que les distingue la pathologie classique, on y trouve exposés les troubles de la nutrition dans les maladies, tels que doit les étudier la pathologie générale.

Un index alphabétique très complet, qu'on pourra consulter comme un véritable « dictionnaire », facilitera la recherche des renseignements que l'ouvrage contient, sur des points particuliers.

La Librairie Masson et Cie envoie gratuitement son catalogue général avec table analytique des matières et des auteurs ou son catalogue méthodique des ouvrages de médecine et ses bulletins de Nouveautés publiés périodiquement.

Les ouvrages édités par la *Librairie Masson et Cie* sont en vente chez tous les libraires. — Les commandes qui sont adressées directement à la *Librairie Masson et Cie*, accompagnées du montant de leur valeur augmentée pour frais de port et d'emballage de 15 % pour la France et de 20 % pour l'étranger, sont exécutées sans délai. — Compte Chèques Postaux, N° 599.

cuti et intradermo-réaction alors que son pouvoir antigène est des plus *faibles* (40 unités). Sa valeur de précipitation est plutôt de *moyenne* grandeur, correspondant à 1/2.500.

TUBERCULINE N° VI. — Tuberculine sans albumose précipitant fortement (1/5.000). Son pouvoir antigène est *faible* (40 unités). Sa valeur réactionnelle, appréciée par la cuti et l'intradermo-réaction, est *moyenne*.

NOTE ADDITIONNELLE

Des recherches intéressantes ont été récemment effectuées par Laidlaw et Dudley (1), Howard Mueller (2), sur la nature de certains éléments spécifiques du bacille tuberculeux ou de la tuberculine. Se basant sur les travaux de Zinsser et Park sur les résidus antigènes du bacille de Koch, et de Avery et Heidelberger sur l'extraction de certains produits du pneumocoque, ces auteurs ont soumis une grande quantité de produits tuberculeux (1 kilogramme de bacilles ou 1 litre de tuberculine brute) à une série de longues et laborieuses manipulations chimiques qui les ont conduits à peu près aux mêmes résultats.

Laidlaw et Dudley sont parvenus à isoler une substance spécifique sous forme d'une poudre blanche, soluble dans l'eau. Les essais d'identification de ce produit leur ont permis de le considérer comme un complexe hydrocarboné du groupe des pentoses. Mis en contact avec un sérum précipitant de cheval, il donne encore une réaction nette en dilution à 1/6.000.000. Quoique cette substance soit spécifiquement précipitable, on ne peut pas cependant la considérer comme un véritable antigène, car elle ne provoque pas la formation d'anticorps et elle n'augmente pas le taux des anticorps du sérum des animaux immunisés. D'autre part elle ne semble avoir rien de commun avec le principe actif de la tuberculine, car les intradermo-réactions effectuées chez les cobayes tuberculeux avec des solutions, même concentrées, restent toujours négatives.

(1) *British Journ. of Exper. Pathology*, t. VI, n° 4, 1925, p. 197.

(2) *Journ. of Exper. Medicine*, 1926, n° 1, p. 1-9.

Howard Mueller a recherché si la fraction de la tuberculine responsable des réactions spécifiques chez le cobaye tuberculeux était, ou non, de nature protéique. Opérant d'abord avec de la tuberculine brute, il a pu constater que les substances précipitables diffèrent de celles qui provoquent les réactions intradermiques. Sous l'action des enzymes protéolytiques, la tuberculine perd la propriété de donner des réactions cutanées. D'autre part, par acidification du précipité alcoolique, on obtient un précipité donnant seulement la réaction cutanée. Si, par contre, le précipité alcoolique de la tuberculine est traité par l'acide tannique, il se forme une substance donnant une forte réaction de floculation et pas de réactions cutanées.

Utilisant ensuite une tuberculine préparée sur un milieu synthétique, il est parvenu, après de nombreuses précipitations alcooliques et acides, à isoler une substance précipitable par un sérum spécifique en dilution à 1 p. 2.000.000, et ne provoquant pas de réaction cutanée en dilution à 1 p. 1.000. Elle contient 0,3 p. 100 d'azote, un peu de phosphore, et elle donne, comme celle isolée par Laidlaw, les réactions typiques des hydrates de carbone. Elle possède aussi la propriété de fixer le complément. Aussi Mueller conclut-il que la tuberculine ne peut pas être titrée par les réactions de précipitation ou de fixation du complément parce que, dans ces méthodes, interviennent des facteurs différents de ceux qui déterminent les réactions cutanées.

TRANSMISSION EXPÉRIMENTALE DU BOUTON D'ORIENT (CLOU DE BISKRA) A L'HOMME PAR PHLEBOTOMUS PAPATASI (SCOPOLI).

par EDM. et Et. SERGENT, L. PARROT, A. DONATIEN et M. BÉGUET.

Le 21 novembre 1924, M. Roux, directeur de l'Institut Pasteur de Paris, présentait à l'Académie des Sciences, en notre nom, une note dans laquelle nous relations brièvement une expérience positive de transmission de la leishmaniose cutanée (clou de Biskra) à l'homme, par l'intermédiaire d'un Psychodidé piqueur du groupe des Phlébotomes, *Phlebotomus papatasi* (Scopoli) [12]. L'observation clinique du bouton d'Orient ainsi obtenu, l'étude du virus isolé de la lésion et diverses autres préoccupations scientifiques ont longtemps retardé la publication des détails de cette expérience. Nous les exposons aujourd'hui.

I. — Hypothèses étiologiques.

On sait le nombre important de travaux et d'hypothèses auxquelles l'épidémiologie et l'étiologie du bouton d'Orient donnèrent lieu depuis plus d'un siècle et surtout au cours des vingt-cinq dernières années. L'historique en a été tracé de façon magistrale par A. Laveran [9]. Tour à tour, l'eau de boisson (Willemain, Poggioli), l'action irritante des poussières siliceuses du désert (Sonrier), la débilitation de l'organisme provoquée par le climat saharien (Alix, Sériziat), la mouche domestique (A. Laveran, Carter, Row, Wenyon), puis des Arthropodes piqueurs ; la punaise (Patton, *Cimex rotundatus*), des Culicides (Edm. et Et. Sargent, *Grabhamia subtilis* ; A. Billet, *Anopheles chaudoyei* ; Wenyon, *Culex fatigans*, *Stegomyia fasciata*), les Simulies (Fink) ont été suspectés de favoriser ou de déterminer l'apparition de la dermatose.

RÔLE DU PHLÉBOTOME. — En septembre-octobre 1904, Edm. et Et. Sergent se font piquer sans résultat par une quinzaine de phlébotomes, à Biskra, dans une maison où des boutons d'Orient avait été précédemment contractés [4]. Pressat, dans un ouvrage paru en 1905 [2], figure un diptère qu'Edm. Sergent reconnaît, la même année, comme étant un *Phlebotomus* [3], avec cette légende : « semble jouer un rôle important dans la propagation du bouton d'Orient ». Plus tard (1909), malgré l'insuccès des premières tentatives de Biskra, Edm. Sergent persiste à considérer le phlébotome, et nominativement *Phlebotomus papatasi*, comme l'agent inoculateur de la leishmaniose [4-5]. Wenyon, en 1911, bien qu'inclinant à soupçonner surtout le *Stegomyia* de transmettre le « bouton des dattes » de Bagdad, n'exclut pas le rôle possible des *Phlebotomus* [6]. En 1914, les connaissances alors acquises sur la biologie de ces petits insectes, dont certains parasitent normalement les Reptiles (Roubaud, Howlett, Townsend, Schannon), et la découverte chez un lézard très commun à Biskra, le gecko ou tarente (*Tarentola mauritanica* L.), d'un flagellé sanguicole morphologiquement très voisin des formes de culture de *Leishmania tropica*, conduisent Edm. Sergent, Et. Sergent, G. Lemaire et G. Senevet à formuler la double hypothèse de *Phl. minutus* var. *africanus* « vecteur » et de *Tarentola mauritanica* « réservoir de virus » du bouton d'Orient [7-8]. En 1919, Patton admet également qu'en Mésopotamie la leishmaniose cutanée est étroitement liée à la présence des phlébotomes [10].

NOUVELLES OBSERVATIONS ÉTIOLOGIQUES. — Interrompues durant la grande guerre, les recherches de l'Institut Pasteur d'Algérie concernant l'étiologie du bouton d'Orient furent activement reprises dès 1919. L'observation attentive du foyer endémique de Biskra et l'étude des Arthropodes vulnérants de la région nous amenaient bientôt à incriminer derechef, et par éliminations successives, *Phlebotomus papatasi*. L'absence de punaises dans les milieux purement indigènes où sévit le « clou de Biskra », le siège assez fréquent des boutons sur certaines parties du corps, la face dorsale des pieds et les malléoles, par exemple, qui, chez les Européens, ne sont généralement découvertes que pendant la nuit, la constatation de

cas authentiques en un point désert où manquaient totalement les moustiques nous permettaient d'écarter une fois de plus les Cimicides, puis les insectes piqueurs diurnes (Tabanides, Stomoxes, Cératopogoninés, Simulies), puis encore, parmi les piqueurs nocturnes, les Culicides. Les habitudes sous-vestimentaires des poux de corps et des Pulicides formaient, d'autre part, un contraste trop évident avec les localisations communes de l'affection, ainsi que Wenyon l'avait déjà fait remarquer [6], pour qu'on pût hésiter à les négliger d'emblée. Enfin, dans le groupe même des phlébotomes, qui restaient ainsi seuls suspects (1), les mœurs de *Phlebotomus* var. *africanus*, peu domestique et dont la prédilection pour les Reptiles nous apparut plus étroite encore et plus exclusive qu'il ne nous avait de prime abord semblé, opposées à celles de *Phlebotomus papatasi*, à ses fréquents rapports avec l'homme; la prédominance de cette dernière espèce sur les autres représentants du genre et leur extrême abondance dans la région de Biskra fixaient décidément l'orientation de nos efforts.

II. — Étude expérimentale.

C'est ainsi qu'en juin 1921 un programme de travail fut établi comportant : 1° la capture, aussi intensive qu'il se pourrait, de *Phl. papatasi* femelles en diverses localités du Sud constantinois connues comme infectées de bouton d'Orient (oasis d'El Kantara, d'El Outaya et de Biskra), durant la saison chaude imminente; 2° leur transport, à l'état vivant, jusqu'à l'Institut Pasteur à Alger, soit à une distance de 600 kilomètres; 3° des essais de transmission de la leishmaniose à l'homme, par piqûres visibles, en nourrissant ces insectes, à Alger, sur quatre sujets volontaires « neufs » ou apparemment tels; 4° dans le cas où les *papatasi* se refuseraient à piquer,

(1) La théorie de la transmission directe de la leishmaniose cutanée, de malade à homme sain, défendue par G. Blanc et J. Caminopetros [41] pour le bouton de Crète, ne peut être invoquée dans la très grande majorité des cas algériens de bouton d'Orient. Elle n'expliquerait d'ailleurs pas l'apparition de clous sporadiques hors des grands centres d'endémie. La même objection s'applique à l'hypothèse de la propagation, mécanique ou autre, par la mouche domestique.

des essais de transmission par l'inoculation aux mêmes sujets du produit de broyage de phlébotomes dans une quantité minime d'eau physiologique ; 5° accessoirement, et si le nombre des insectes parvenus vivants à Alger le permettait, l'inoculation à la souris blanche et au singe soit de ce produit de broyage même, soit des flagellés qu'on en pourrait obtenir par la culture ; 6° la recherche directe des flagellés dans l'organisme des *papatasi*, après dissection, et dans le liquide employé aux diverses inoculations.

*
* * *

La première partie de ce programme fut réalisée du 15 juillet au 15 septembre 1921. Elle avait pour point de départ l'idée que, vu, d'une part, le petit nombre des atteintes annuelles de bouton d'Orient parmi les populations de la zone d'endémie leishmanienne et étant donné, d'autre part, la fréquence des phlébotomes et la multiplicité de leurs attaques dans cette zone, la proportion des insectes infectants ou porteurs de virus devait être très faible. En deux mois, on recueillit 2.666 *Phl. papatasi* ♀, dont plus de la moitié à Biskra, dans les bâtiments de l'hôpital militaire. A cette occasion, on put vérifier que les seuls phlébotomes existant à Biskra sont *Phl. papatasi* et *Phl. minutus* var. *africanus*, constatation qui facilita beaucoup la détermination, à l'état vif, des femelles capturées [13]. Il suffit, en effet, d'un peu d'habitude — et, dans le cas particulier, le capteur n'en manquait point — pour distinguer ces deux espèces l'une de l'autre, au premier coup d'œil et à distance.

Sur les 2.666 *papatasi* récoltés, 2.282 (1) furent expédiés à Alger, en trente envois successifs, formant 23 lots. Les insectes eurent beaucoup à souffrir du transport qui s'effectuait par la poste et durait en moyenne trois jours. La plupart (1.723) succombèrent en cours de route. Malgré les précautions prises (enveloppement des blocs-cages d'expédition dans du papier mouillé et de l'herbe verte), leurs cadavres arrivaient à l'Institut complètement secs et inutilisables. Dans ces conditions, on dut réduire le nombre des inoculations prévues pour les

(1) A ce chiffre s'ajoutent 8 *Phl. perniciosus* et 56 *Phl. minutus* var. *africanus* capturés fortuitement à El Kantara, en même temps que des *papatasi*, d'un même coup de tube de chasse.

souris blanches et pour les singes et s'inquiéter surtout des essais de transmission à l'homme. Encore les phlébotomes survivants parvinrent-ils à destination fort mal en point; toutes les tentatives faites, de nuit comme de jour, en vue de les décider à piquer restèrent infructueuses. Dès lors, il fallut limiter les expériences à l'inoculation du produit de broyage des *papatasi*.

*
* *

EXPÉRIENCES DE TRANSMISSION. — On procéda uniformément d'après la technique suivante : à leur arrivée, les phlébotomes sont tués par des vapeurs de chloroforme, leurs appendices, pattes et ailes sectionnés. On les triture ensuite dans un verre de montre, avec quelques gouttes d'eau physiologique à 9 p. 1.000. Puis, la plus grande partie de la suspension ainsi obtenue est déposée sur des scarifications de la peau, pratiquées au vaccino-stylé sur les avant-bras des volontaires Sed..., Set..., D... et B..., en des points minutieusement repérés. On examine le reste au microscope, soit directement, soit après coloration au Giemsa, pour la recherche des formes flagellées ou autres du virus du bouton d'Orient. Les *papatasi* composant un même lot sont broyés ensemble et inoculés à un seul et même volontaire. Chez les souris blanches, le liquide est injecté à la seringue dans la cavité péritonéale; pour le singe (*Macacus inuus*), on opère de la même façon que pour l'homme.

Les tableaux ci-dessous (I, II, III, IV) donnent, en ce qui concerne chaque sujet d'expérience, le nombre de *papatasi* ♀ expédiés du Sud constantinois, la date et le lieu de leur capture, le nombre d'exemplaires survivants broyés et inoculés, la date de l'inoculation à l'homme et, quand il y a lieu, à la souris ou au singe, et enfin le résultat obtenu. Il n'est pas sans intérêt de noter ici que les volontaires Sed..., Set... et B... sont nés en Algérie et ont séjourné à plusieurs reprises et longuement, durant l'été ou durant l'automne, en pays de bouton d'Orient. D..., au contraire, habite la colonie depuis dix-huit mois seulement; il n'a fait qu'un seul et rapide voyage au Sahara, en octobre 1920.

A la suite de ces inoculations répétées, les volontaires Sed...,

Set... et B... ne présentèrent rien d'anormal. Les petites plaies de la peau produites par les scarifications guérissent toutes en trois ou quatre jours sans laisser de trace. Il en alla de même chez l'unique singe employé. Les souris blanches moururent au bout de dix à quarante jours; l'examen microscopique de leurs divers organes, la rate et le foie en particulier, ne montra aucun signe de contamination. En revanche, le volontaire D... vit apparaître, le 13 novembre 1921, en un point de son avant-bras gauche, *correspondant exactement*, d'après les repères, *à l'inoculation du 20 août* (7 Phl. *papatasi*!), un bouton d'Orient typique dont l'évolution devait durer sept mois. En voici maintenant l'histoire.

Observation clinique et parasitologique. — Jusqu'au 13 novembre 1921, D... n'a présenté aucun trouble de l'état général. Comme chez les autres volontaires, toutes les scarifications d'inoculation ont guéri très rapidement. Le 13 novembre au matin, D... constate l'existence, sur le tiers supérieur de son

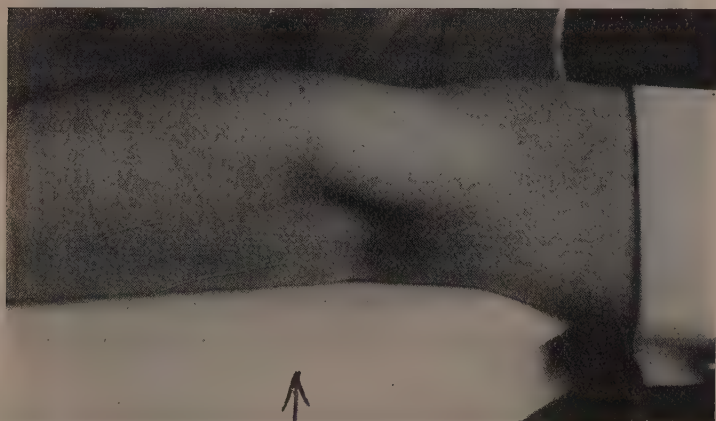


FIG. 1. — Bouton d'Orient expérimental au seizième jour.

avant-bras gauche, à 3 centimètres au-dessous du pli du coude — point précis où, comme nous venons de le dire, des scarifications avaient été opérées le 20 août — d'une papule centrée d'une petite croûte, non douloureuse et non prurigineuse. Le 14 novembre, l'aspect de la lésion est le suivant : papule ronde, rougeâtre, de 4 millimètres de diamètre, entourée d'une collerette épidermique rappelant la collerette de Bielt des papules syphilitiques. Au centre, fine croûte adhérente, de 2 millimètres à peine. Au-dessous de cette croûte, une ulcération punctiforme. En dehors de la papule, zone d'infiltration hyperhémique de 1 centimètre de diamètre. Pas de réaction ganglionnaire, épitrochléenne ou axillaire.

L'examen microscopique du produit de grattage au vaccinostyle de l'ulcération sous-jacente à la croûte y décèle des *Leishmania* nombreuses, libres ou englobées par des macrophages. Même constatation le 1^{er} décembre.

Le bouton grossit lentement au cours des jours suivants (fig. 1). Le 7 décembre, la papule proprement dite atteint 5 millimètres de diamètre, la croûte, qui s'est reformée et saillit davantage, 3 millimètres, et la zone d'infiltration périphérique, de teinte violacée, 15 millimètres. La croûte enlevée, l'ulcération primitive, presque comblée, apparaît moins profonde : il s'agit plutôt d'une simple érosion. A cette date, la papule est légèrement

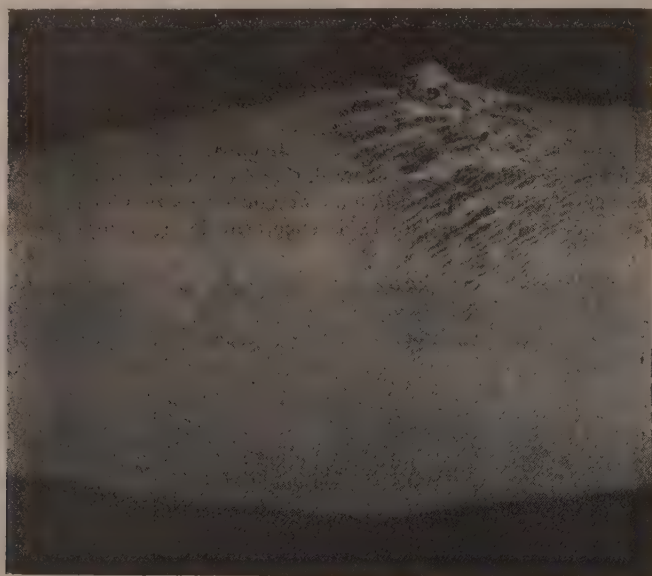


FIG. 2. — La lésion après quatre mois et demi. Vue de profil.

scarifiée au vaccinostyle, sous teinture d'iode; on ensemence à la pipette la sérosité qui en sort dans 13 tubes de gélose NNN. La culture est reconnue positive le 14 décembre : 4 des tubes, placés à l'étuve à 22-24°, contiennent de nombreuses formes *Leptomonas*.

Le 16 décembre, la croûte centrale s'est détachée spontanément. Il n'y a plus d'ulcération sous-jacente. La papule, de 6 millimètres de diamètre, rouge sombre, apparaît uniformément plane et recouverte d'une mince pellicule brillante, aux reflets nacrés. L'auréole érythémateuse, de teinte vineuse, s'est un peu allongée transversalement vers le bord externe du membre et ovalisée. Elle mesure 18 × 20 millimètres. Desquamation légère à la surface. L'examen microscopique de la sérosité obtenue par scarification de la papule montre de nouveau des *Leishmania* nombreuses, libres ou intra-leucocytaires.

Le 13 janvier 1922, la lésion, dont les dimensions n'ont pas sensiblement

changé, offre l'aspect d'un placard érythémato-squameux, lupiforme, à squames assez nombreuses et adhérentes, d'un rouge vineux marqué. Un peu en dedans du centre, une croûte s'est reformée, acuminée, de 3 millimètres de diamètre. Sous cette croûte, d'une ulcération de 2 millimètres, à bords nets et taillés à pic, exsude un liquide clair, très riche en *Leishmania*.

Le 1^{er} février, même aspect général. La croûte acuminée, grisâtre et sèche, a seulement un peu grossi (3 millimètres). Le placard érythémato-squameux s'est encore étendu vers la face postéro-externe de l'avant-bras; il mesure

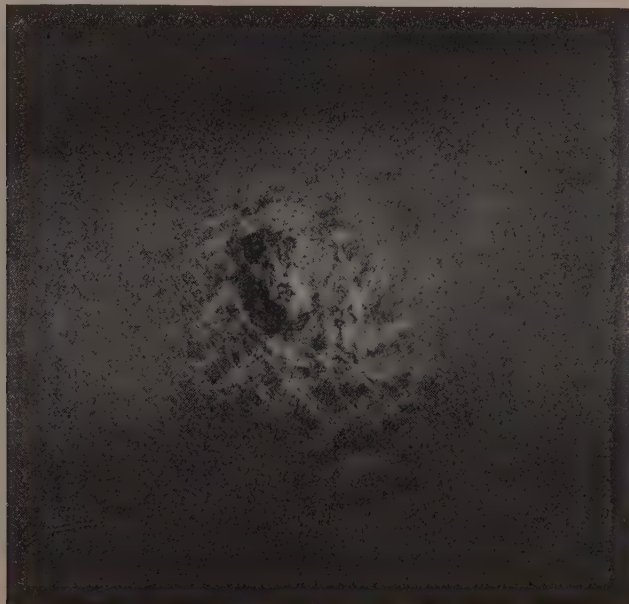


FIG. 3. — La lésion après quatre mois et demi. Vue de face.

20×23 millimètres. Le 15 février, ses dimensions sont de 30×45 millimètres.

Du 15 février au 7 avril, cette extension progressive de la zone d'infiltration érythémato-squameuse continue jusqu'à atteindre 40×69 millimètres. La croûte excentrique, toujours sèche et très adhérente, saillit de plus en plus en un cône irrégulier, mesurant 10 millimètres à la base (fig. 2 et 3). Le 7 avril, un cataplasme de fécule de pomme de terre est appliqué, qui la détache ainsi qu'une partie des squames périphériques et découvre une ulcération irrégulièrement ovale, à grand axe perpendiculaire à l'axe de l'avant-bras, mesurant 15 millimètres de longueur sur 9 millimètres de largeur en son milieu et d'une profondeur moyenne de 3 millimètres. Les bords en sont taillés à pic, le fond bourgeonnant (fig. 4). Ce cratère occupe le tiers interne du placard érythémato-squameux qui montre, à la place des squames tombées, une série de dépressions cupuliformes et de fissures minuscules.

L'examen microscopique décèle encore la présence de *Leishmania* peu nombreuses dans le produit de raclage au vaccinostyle du fond de l'ulcération principale.

A partir du 7 avril, le bouton est pansé, deux fois par jour, avec des compresses imbibées d'une solution d'urotropine à 5 p. 100, suivant la méthode préconisée par F. G. Duckworth (1). Rapidement, l'ulcération principale et les petites ulcérations secondaires satellites évoluent vers la guérison; l'ensemble de la plaque érythémateuse prend une teinte rosée vive; cratère, cupules et fissures se combient par bourgeonnement. Le 2 mai, la cicatrisation paraissant presque complète, on cesse les pansements à l'urotropine

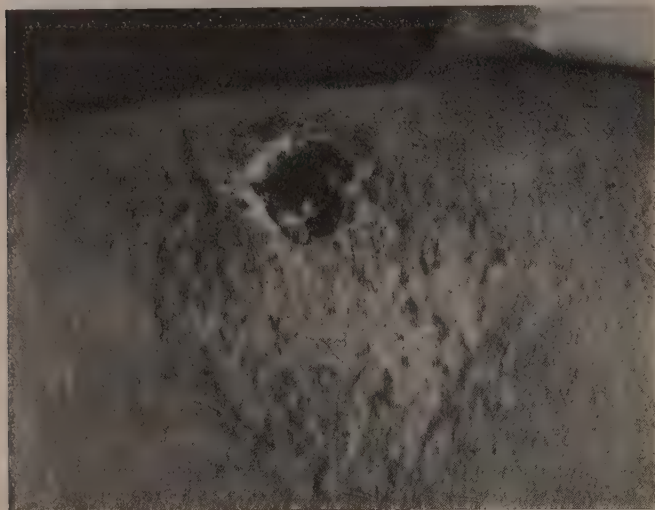


FIG. 4. — Cinquième mois. La lésion après la chute de la croûte.

pour y substituer des applications de dermatol en poudre. On assiste alors à une aggravation subite. Le cratère s'ouvre de nouveau; la zone d'infiltration se creuse d'érosions, de dépressions multiples, serpigneuses, suintantes et bientôt recouvertes de croûtes épaisses. Le 8 mai, après décapage, elle apparaît fissurée, ravinée, comme vermoulue. On trouve pour la dernière fois des *Leishmania* non rares dans l'exsudat du cratère et au niveau d'une petite ulcération secondaire de la marge érythémateuse.

Du 8 mai au 1^{er} juin, les pansements à l'urotropine sont repris, avec le même résultat que précédemment. Guérison définitive le 15 juin, sept mois après la première constatation de la papule initiale. Il reste une cicatrice rose foncé, criblée de dépressions polymorphes, qui se pigmente rapidement et fortement par la suite. Aujourd'hui (décembre 1925) cette cicatrice indélébile mesure 35 × 55 millimètres. La pigmentation s'est beaucoup atténuée;

(1) F. G. DUCKWORTH, Oriental sore. *Practitioner*, 106, n° 5, mai 1921, p. 377.

les dépressions présentent une teinte blanc nacré qui tranche avec le ton rouge de certaines saillies chéloïdiennes apparues peu à peu au voisinage du siège de l'ulcération principale et sur la partie inféro-externe de la zone d'infiltration où elles revêtent la forme de deux cordons parallèles (fig. 5).

Pendant toute la durée de son évolution, la lésion ne s'est accompagnée d'aucune douleur spontanée; elle était cependant très sensible au contact, surtout lorsque la chute de la croûte protectrice eut mis l'ulcération à nu. A



FIG. 5. — La cicatrice après quatre ans.

aucun moment, on n'a constaté de réaction ganglionnaire ni de lymphangite. Pas de signes fébriles. A trois reprises, en février, mars et avril 1922, et à trois semaines d'intervalle chaque fois, D... a été atteint de troubles généraux, caractérisés par des crises de tachycardie et de polyurie, surtout nocturnes, et de la lassitude, dont l'origine n'a pu être exactement précisée, mais vraisemblablement attribuables au surmenage intellectuel et physique. D... se livrait, en effet, à ce moment, à des travaux de laboratoire aussi absorbants que pénibles.

Des examens successifs du sang de D... ont montré des modifications de la formule leucocytaire toutes pareilles à celles que l'on observe dans les cas de bouton d'Orient naturels : mononucléose, avec prédominance tantôt des lymphocytes leucocytoides, tantôt des lympholeucocytes (grands mononucléaires et formes de transition). Les résultats de ces examens sont résumés ci-dessous :

EXPÉRIENCE D : Formule leucocytaire.

	1 ^{er} DÉCEMBRE 1921	1 ^{er} FÉVRIER 1922	28 MARS 1922	49 AVRIL 1922	7 MAI 1922	23 JUIN 1922
Poly. neutrophiles.	64	35	35	53	45	68
— éosinophiles.	3	1,5	1,5	1	2	3,5
— basophiles.	0	0	0	1 (1)	1,5 (1)	1 (1)
Lymphocytes vrais.	21,5	8,5	5	1,5	10	13
— leucocytoïdes.	6,5	12,5	28,5	26,5	32,5	8
Lympholeucocytes.	5	42,5	30	18	9	6,5

(1) L'apparition des polynucléaires basophiles (mastzellen) est consécutive à un traitement préventif de la rage que D. dut subir au cours de la deuxième quinzaine de mars 1922. Pour ces divers examens, le sang était prélevé au niveau du lobule de l'oreille.

RECHERCHE DU PARASITE CHEZ LES PHLÉBOTOMES. — La recherche du parasite du bouton d'Orient, à l'état frais ou après coloration au Giemsa, dans le liquide de broyage qui servit aux expériences de transmission donna un résultat négatif pour tous les lots d'insectes, y compris le lot infectant du 20 août. D'un autre côté, l'examen du contenu du tube digestif de 423 *papatasi* et de 41 *minutus* var. *africanus* ♀, pratiqué dans le Sud constantinois quelques heures après la capture, ne fut pas plus heureux [13].

Étude du virus transmis par Phl. papatasi.

Du point de vue morphologique, les *Leishmania* vues à plusieurs reprises sur les frottis provenant du bouton de D... et les *Leptomonas* obtenues par la culture en milieu NNN, à 22-24°, ont montré tous les caractères, d'ailleurs assez peu distinctifs, qu'il est classique d'attribuer à *Leishmania tropica* : 1° organismes ronds ou ovoïdes, libres ou contenus dans des macrophages, de 2 à 5 μ de diamètre ou de longueur sur 2 à 4 μ de largeur, pourvus d'un noyau, d'un centrosome arrondi ou bacilliforme et d'un rhizoplaste [15]; 2° flagellés polymorphes, ronds, ovalaires, piriformes ou fusiformes, très mobiles, mesurant de 4 à 20 μ de longueur, non compris le flagelle, sur 1 μ 5 à 4 μ de largeur et se multipliant par division longitudi-

nale; noyau médian ou submédian; centrosome situé dans le tiers antérieur de l'élément; flagelle dépassant sensiblement en longueur le corps proprement dit; pas de membrane ondulante. Tendance marquée à la formation de rosaces dans les tubes de culture (NNN et milieu liquide hémoglobinisé de Row). Ces formes *Leptomonas* ont pu être conservées jusqu'à ce jour (décembre 1925), soit pendant plus de quatre ans, et subir 77 repiquages en NNN sans rien perdre ni de leur apparence objective, ni de leur faculté de multiplication *in vitro*.

L'observation directe et la culture ne permettant pas d'identifier, avec toute la rigueur désirable, le virus transmis à l'homme par *Phl. papatasi*, c'est-à-dire de l'assimiler définitivement à *Leishmania tropica*, il était indiqué de vérifier si l'inoculation à des animaux sensibles corroborerait les arguments fournis déjà, en faveur de cette assimilation, par l'aspect clinique et l'évolution du bouton de D. Les expériences entreprises dans ce sens ont porté sur la souris blanche et sur le chien.

INOCULATIONS A LA SOURIS BLANCHE. — On sait, depuis les travaux de R. Row, de R. Gonder et de A. Laveran [9] que le virus du bouton d'Orient est transmissible à la souris blanche, chez qui il provoque soit une infection généralisée, avec ou sans lésions de la peau, soit des tuméfactions ulcératives au niveau du testicule et du scrotum. Ces dernières se produisent avec une grande fréquence, sinon de façon constante, lorsqu'on introduit les flagellés de culture directement dans le testicule ou dans la cavité péritonéo-vaginale.

Le 24 avril 1922, on inocule 6 souris blanches mâles, par la voie péritonéale, chacune avec 1/2 cent. cube de cultures en milieu NNN (liquide de condensation) du virus D, provenant du sixième repiquage et âgées de vingt et un jours. 5 de ces souris meurent au bout de deux à trois mois et demi, non infectées. La sixième succombe après quatre mois et huit jours. L'examen microscopique révèle la présence de *Leishmania* nombreuses dans la rate, le foie et les testicules. Aucune lésion cutanée.

Le 12 août, 5 souris blanches mâles reçoivent par la même

voie 1/2 cent. cube de cultures du onzième repiquage, âgées de vingt et un jours, à flagellés et formes rondes assez nombreuses. Pas d'infection.

Le 3 novembre, 1 souris blanche mâle est inoculée, par la voie péritonéale encore, avec le liquide de condensation de 4 tubes d'une culture du quinzième passage, âgée de douze jours, contenant de très nombreuses formes flagellées, la plupart agglutinées en rosaces énormes. 5 autres souris reçoivent le liquide de condensation de 2 à 5 tubes de la même culture dans le testicule et le récessus vagino-péritonéal droits. Ces 6 animaux sont sacrifiés ou succombent au bout de trois à cinq mois et demi après avoir présenté toutes les mêmes lésions : tuméfaction croissante de la région scrotale, puis ulcération de la peau à ce niveau ; très nombreuses *Leishmania* dans les tissus péritesticulaires, le foie, la rate, la moelle osseuse, les ganglions lymphatiques et dans un certain nombre de leucocytes du sang du cœur. L'histoire d'une de ces souris peut être relatée comme typique des infections ainsi obtenues.

Souris ♂ n° 6. — Inoculée le 3 novembre 1922 dans le testicule droit avec le contenu de 5 tubes NNN. Le 2 décembre, la tuméfaction scrotale commence ; les deux testicules, saillants, surtout le droit, ont perdu leur mobilité et « ne rentrent plus ». Le 20 décembre, la tumeur égale en volume un gros pépin d'orange. Le 17 janvier 1923, elle a atteint le diamètre d'une grosse noisette. Au centre, petite croûte recouvrant une ulcération ronde, de 3 millimètres d'où s'écoule un pus épais, de teinte rougeâtre, très riche en *Leishmania*. Le 9 mars, cette ulcération mesure à peu près le diamètre d'une pièce de 1 franc ; le fond est constitué par un tissu lardacé, blanc-gris, très friable. Au-dessus, croûte dure qui s'enlève d'un bloc, comme un opercule. Vers le 17 avril, une sorte de sillon d'élimination se creuse tout autour de la lésion. L'animal maigrit très visiblement. Il meurt cachectique le 18 mai. A l'autopsie on constate que la peau de la région scrotale entière a disparu ; le testicule droit est aux trois quarts détruit, le testicule gauche intact, mais un peu grossi et dur à la coupe. Hypertrophie très marquée de la rate et des ganglions lymphatiques sous-cutanés précuraux. Présence de nombreuses *Leishmania* dans la rate, le foie, le testicule droit, et le sang du cœur.

Des essais de transmission de l'infection de souris à souris par la voie testiculaire ont donné également un résultat positif. L'évolution des lésions a seulement été plus rapide.

Le 10 avril 1923, la souris ♂ 7 reçoit *intra testem* 1/4 de cent. cube du produit de broyage, dans l'eau physiologique, de la tumeur testiculaire de la

souris ♂ 1, inoculée par injection intrapéritonéale de cultures du quinzième passage. Le 30 avril, petite tumeur sous-cutanée, de la grosseur d'un pois, à droite du scrotum. Le 10 mai, petite croûte de 2 millimètres au centre de la saillie para-scrotale. Le 4 juin, cette croûte atteint 8 millimètres de diamètre. Au-dessous, ulcération d'où s'écoule un pus épais, contenant de très nombreuses *Leishmania*. L'animal se cachectise rapidement et meurt le 11 juin, en deux mois. L'autopsie montre une tumeur para-scrotale ulcérée, englobant le testicule droit. Le testicule gauche est normal et mobile. La rate, très augmentée de volume, mesure 20×8 millimètres. Le ganglion précural droit est également très hypertrophié. Présence de *Leishmania* nombreuses dans la paroi de l'ulcération, le ganglion précural droit, la rate, le foie et le sang du cœur (à l'intérieur de grands mononucléaires, et même libres).

La souris ♂ 8, inoculée le même jour, dans les mêmes conditions, meurt le 6 juin après avoir présenté aussi une tumeur para-scrotale, bientôt ulcérée. On trouve des *Leishmania* assez nombreuses dans le ganglion précural droit correspondant au point d'inoculation. La rate, d'ailleurs de taille à peu près normale, ne contenait pas de parasites, non plus que le foie.

Ainsi le virus leishmanien isolé du bouton expérimental de D... a produit chez la souris blanche exactement les mêmes lésions que celles qu'on est accoutumé de voir apparaître à la suite de l'inoculation de *Leishmania tropica* d'origine naturelle. Fait assez remarquable, la virulence des cultures pour cet animal ne s'est pas intégralement maintenue au cours des passages successifs *in vitro*. C'est ainsi que 11 souris blanches mâles inoculées *intra testem* entre le 4 septembre 1924 et le 31 janvier 1925, avec des cultures des cinquante et unième, cinquante-deuxième, cinquante-quatrième, cinquante-cinquième, cinquante-sixième et cinquante-neuvième repiquages n'ont montré aucun signe d'infection. 2 d'entre elles vivent encore, après quinze et quatorze mois.

INOCULATIONS AU CHIEN. — Ch. Nicolle et Manceaux, puis A. Laveran ont bien établi la réceptivité du chien domestique à l'égard du bouton d'Orient. L'inoculation ou l'insertion dans le derme de cultures ou de tissus parasités est suivie, à plus ou moins longue échéance, de la formation d'un nodule dur, qui peut s'ulcérer, se recouvrir de croûtes et qui guérit généralement après plusieurs mois d'évolution.

Un premier essai de transmission de virus D. au chien, effectué suivant la technique de A. Laveran (insertion de fragments d'organes de souris infectée dans des incisions de la peau) échoua.

Chien n° 20. — Le 30 octobre 1922, trois petites incisions sont pratiquées au vaccinostyle sur la face externe de la cuisse droite, préalablement rasée et aseptisée, et autant sur la face externe de la cuisse gauche. On y introduit des fragments de rate, de foie et de testicule provenant d'une souris inoculée avec des cultures du sixième repiquage et contenant de nombreuses *Leishmania*. Ces organes avaient été conservés à la glacière pendant dix-sept heures. Le chien meurt de misère physiologique le 21 novembre suivant. A l'autopsie on ne trouve aucune trace de réaction locale; l'examen microscopique du foie et de la rate ne décèle point de parasites.

Une nouvelle expérience fut tentée, en employant cette fois une technique plus sûre.

La souris I, inoculée le 3 novembre 1922, par la voie péritonéale, avec 4 tubes de culture du quinzième passage, est sacrifiée le 10 avril 1923. La tumeur scrotale, riche en *Leishmania*, dont elle est porteur, est prélevée et broyée dans quelques centimètres cubes d'eau salée à 9 p. 1.000. Le liquide de broyage est injecté aussitôt, à la seringue, dans le derme de la peau du front des chiens 4, 22, 52, 53 et 54, à la dose de 1/5 de cent. cube.

Ces cinq chiens réagissent à l'inoculation de façon identique : apparition rapide d'un nodule dermique plan, centré d'une ulcération qui se creuse et grandit peu à peu jusqu'à atteindre 15 millimètres de diamètre, se recouvre d'une croûte assez adhérente et guérit au bout de un à trois mois suivant les cas. On trouve régulièrement des *Leishmania* assez nombreuses dans les frottis provenant des ulcérations. Les parasites sont, pour la plupart, ovoïdes ou légèrement fusiformes et d'une taille un peu supérieure à celle des *Leishmania* de la souris ou du bouton humain originel : 5 à 6 μ de longueur en moyenne au lieu de 3 à 5 μ . L'observation des chiens 53 et 54 donne une idée nette de la marche des lésions locales dans cette série d'inoculations positives.

Chien n° 53. — Inoculé le 10 avril 1923 dans la région frontale moyenne, sous une application de teinture d'iode, par injection intradermique de 1/5 de cent. cube de liquide de broyage de la tumeur scrotale de la souris I. Le 17 avril, au point d'inoculation, petit nodule dermique de la grosseur d'un grain de chènevis. Croûte au centre, recouvrant une ulcération en cupule de 2 millimètres de diamètre. Présence de *Leishmania* assez nombreuses. Le 24 avril, le nodule s'est étalé, aplati. Le 5 mai, l'ulcération mesure 6 millimètres, 8 millimètres le 23 mai. Le 5 juin, la croûte est tombée spontanément, mettant à nu une ulcération ronde, en cratère, peu profonde et presque sans bords, saignante, de 12 millimètres de diamètre et reposant sur une base indurée de dimensions un peu supérieures. Dans son ensemble et par la consistance cartonnée de sa base, la lésion rappelle assez bien un

chancre syphilitique. La croûte se reforme ultérieurement. Le 28 juin, la cicatrisation commence; elle est complète à la fin de juillet 1923.

Chien n° 54 (galeux). — Inoculé comme le précédent. Le 17 avril légère induration dermique au point d'inoculation. Croûte centrale et ulcération sous-jacente de 3 millimètres de diamètre. Présence de *Leishmania* assez nombreuses. L'ulcération s'étend de jour en jour; elle mesure 6 millimètres le 24 avril, 8 millimètres le 5 mai, 12 millimètres le 23 et 15 millimètres le 4 juin. A cette dernière date, elle offre aussi l'aspect d'un cratère arrondi, sans bords et peu profond, dissimulé par une pellicule croûteuse brunâtre et reposant sur un disque d'infiltration de consistance cartonnée. Guérison le 19 juillet 1928.

Nous pouvons donc appliquer au cas du chien domestique l'affirmation déjà formulée à propos des souris blanches, à savoir que l'inoculation du virus D. a déterminé chez cet animal des réactions locales, nodulaires et ulcératives, tout à fait semblables à celles que différents expérimentateurs ont obtenues avec *Leishmania tropica*.

*
* *

Ainsi, qu'on considère la durée de l'incubation, l'évolution et l'aspect clinique du bouton expérimental ou qu'on envisage la nature du germe qui l'a produit et ses propriétés pathogènes, la même conclusion s'impose; il y a identité spécifique entre *Leishmania tropica* (Wright) et le virus contenu dans le lot de phlébotomes infectants inoculé à l'homme le 20 août 1921; *Phlebotomus papatasi* est l'agent vecteur du parasite du bouton d'Orient à Biskra.

Cette dernière proposition, par laquelle nous terminions notre communication préliminaire à l'Académie des Sciences, a donné matière à quelques critiques. G. M. Wenyon (1) a fait remarquer, par exemple, que les *papatasi* infectants ont pu se nourrir, à Biskra, sur un bouton d'Orient peu avant leur capture, se gorger de virus et jouer en définitive le simple rôle d'agents mécaniques de transport. Des punaises, nourries, expédiées, inoculées de même, auraient procuré semblable résultat. L'expérience prouve seulement que le virus peut

(1). *Tropic. diseases Bull.*, 19, n°s 3 et 4, 1922, pp. 190 et 316.

survivre pendant trois jours dans l'organisme des phlébotomes.

A la vérité, Wenyon reconnaît qu'une telle contamination est « improbable ». Nous la considérons comme impossible. Durant le temps que l'un de nous a séjourné à Biskra, en juillet, août et septembre 1921, et malgré d'attentives recherches opérées avec le concours des médecins civils ou militaires de la ville (1), aucun cas de bouton d'Orient en évolution n'a été constaté dans la population civile, ni parmi le personnel de l'Hôpital militaire où les insectes étaient récoltés. Un certain nombre de personnes présentaient seulement les cicatrices de « clous » apparus pendant l'automne ou l'hiver précédents, mais complètement guéris. D'autre part, pour qui connaît la situation isolée du fort Saint-Germain, où l'Hôpital militaire est enclos, et pour qui sait les mœurs casanières et la faible portée du vol des phlébotomes, l'hypothèse qu'un *papatasi* suspect soit venu, de loin, troubler la sincérité de l'expérience n'est pas plus admissible. Enfin, de nombreuses observations ont établi qu'à Biskra les boutons d'Orient sévissent à partir de la fin août et guérissent au plus tard en juin [14]. Nous sommes ainsi fondés à écarter l'objection soulevée par G. M. Wenyon.

J. A. Sinton, tout récemment (2), a mis en doute l'identité des phlébotomes utilisés. Se fondant sur les difficultés, parfois insurmontables, de la détermination spécifique des femelles de phlébotomes, surtout à l'état vif, et en particulier sur l'étroite ressemblance de *Phl. papatasi* ♀ avec *Phl. sergenti* ♀, cet auteur admet qu'une confusion a pu se produire. En d'autres termes, il n'est pas démontré que ce soit *Phl. papatasi*, et non telle ou telle autre espèce de phlébotome, qui ait donné le bouton d'Orient. Nous avons déjà indiqué, au début de ce mémoire, combien la diagnose des insectes pris à Biskra avait été facilitée par le fait que, dans cette localité, deux phlébotomes seulement existent : *Phl. papatasi* et *Phl. minutus* var. *africanus*, très visiblement différents l'un de l'autre et par la taille et par la teinte générale. Nous pouvons ajouter ici les précisions sui-

(1) Nous renouvelons nos bien vifs remerciements à nos confrères, les docteurs CRESPIN, CERTAIN et SABRIÉ, médecins-majors, pour leur aide obligeante.

(2) *Ind. Journ. of medic. research.*, 12, n° 4, avril 1925, pp. 706-718.

vantes : à Biskra, tant de juillet à septembre 1921 que, plus tard, en mai-juin 1922, nous n'avons jamais vu un seul *Phl. sergenti* ou *Phl. perniciosus* parmi plusieurs milliers de phlébotomes mâles capturés. Tous étaient soit des *Phl. papatasi*, soit des *Phl. minutus* var. *africanus*. La confusion supposée par Sinton n'a donc pu avoir lieu et l'agent responsable du bouton d'Orient expérimental est, en toute certitude, l'insecte que nous avons soupçonné dès le début de nos recherches, *Phl. papatasi* (Scopoli).

Certes, l'expérience positive que nous avons réalisée laisse encore dans l'ombre maints détails de la transmission de la leishmaniose cutanée, dont nous ne méconnaissons pas l'importance. Comment, entre autres, et sous quelle forme le parasite passe-t-il de l'hôte invertébré à l'hôte vertébré? Existe-t-il, en dehors de l'insecte, un réservoir de virus? Certaines espèces de phlébotomes, autres que *papatasi*, propagent-elles la dermatose dans les multiples foyers endémiques du monde? Mais on admettra sans doute que la partie majeure du problème complexe de l'étiologie du bouton d'Orient a été résolue en 1921. On sait maintenant où trouver à coup sûr le virus hors de l'homme; on connaît quel insecte, parmi les nombreux piqueurs nocturnes et diurnes, l'héberge; on possède le fil d'Ariane qui évite les tâtonnements. On peut encore, sur les données acquises, fonder la prophylaxie du bouton d'Orient. Enfin, et par ailleurs, la démonstration de l'existence de *Leishmania tropica* chez un phlébotome fournit à l'étude de la transmission des autres maladies leishmaniennes, le kala azar, par exemple, de précieuses indications.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Edm. et Et. SERGENT, Sur un Culicide nouveau très commun à Biskra (*Grabhamia subtilis*). *C. R. Soc. de Biologie*, 57, 8 avril 1903, p. 673.
- [2] A. PRESSAT. *Le Paludisme et les Moustiques*. Masson, 1905, pl. III, fig. 2.
- [3] *Bull. Inst. Pasteur*, 3, 1905, p. 626.
- [4] *Bull. Soc. Path. exot.*, 2, 1909, p. 390.
- [5] Edm. SERGENT. *Détermination des Insectes piqueurs et suceurs de sang*. O. Doin, 1909, p. 37.

- [6] G. M. WENYON, Report of six months' work of the expedition to Bagdad on the subject of oriental sore. *Journ. of tropic. med. and hyg.*, **14**, 1911, pp. 103-109.
- [7] Edm. et Et. SERGENT, G. LEMAIRE et G. SENEVET, Insecte transmetteur et réservoir de virus du clou de Biskra. Hypothèse et expériences préliminaires. *Bull. Soc. Path. exot.*, **7**, n° 7, 1914, pp. 577-579.
- [8] Edm. SERGENT, Et. SERGENT, G. LEMAIRE et G. SENEVET, Hypothèse sur le Phlébotome « transmetteur » et la Tarente « réservoir de virus » du bouton d'Orient. *Ces Annales*, **29**, n° 7, 1915, pp. 308-322.
- [9] A. LAVERAN. *Leishmanioses*. Masson, 1917.
- [10] W. S. PATTON, Note on the etiology of oriental sore in Mesopotamia. *Bull. Soc. Path. exot.*, **12**, n° 8, 1919, p. 500.
- [11] G. BLANC et J. CAMINOPETROS, Enquête sur le bouton d'Orient en Crète. Réflexions qu'elle suggère sur l'étiologie et le mode de dispersion de cette maladie. *Ces Annales*, **35**, 1921, pp. 151-166.
- [12] Edm. et Et. SERGENT, L. PARROT, A. DONATIEN et M. BÉGUET, Transmission du clou de Biskra par le Phlébotome (*Phlebotomus papatasi* Scop.). *C. R. Acad. des Sciences*, **173**, 21 novembre 1921, p. 1030.
- [13] L. PARROT, Recherches sur l'étiologie du bouton d'Orient (clou de Biskra). Etudes sur la biologie des Phlébotomes en milieu endémique. *Bull. Soc. Path. exot.*, **15**, n° 1, 1922, pp. 80-92.
- [14] L. PARROT et H. FOLEY, Remarques épidémiologiques sur le bouton d'Orient en Algérie. *Bull. Soc. Path. exot.*, **18**, n° 6, 1925, pp. 485-495.
- [15] L. PARROT et F. LESTOQUARD, Sur quelques détails de la structure des *Leishmania*. *Bull. Soc. Path. exot.*, **18**, n° 7, 1925, pp. 541-546.

(Institut Pasteur d'Algérie.)

AU SUJET DU SÉRO-DIAGNOSTIC DU CANCER LES PHÉNOMÈNES DE RÉDUCTION

par Ch. MONDAIN, R. DOURIS et J. BECK

IMPORTANCE DU PROBLÈME DU SÉRO-DIAGNOSTIC DU CANCER.

Le cancer est encore à l'heure actuelle un mal mystérieux et si des guérisons et des améliorations intéressantes ont pu être obtenues, ce n'est qu'à la condition que le traitement ait pu être effectué assez tôt. D'où l'intérêt de dépister le cancer le plus tôt possible. C'est pourquoi tant d'auteurs ont cherché à établir un procédé de diagnostic du cancer par des réactions chimiques physico-chimiques et sérologiques.

Malgré le nombre considérable de travaux sur cette question, on peut dire qu'il n'existe pas encore de méthode qui puisse être considérée comme un séro-diagnostic du cancer (1).

Parmi le grand nombre de moyens proposés, trois réactions sont encore à l'étude et ne semblent pas avoir résolu le problème. Ce sont :

La réaction de Botelho (2);

La réaction de Fischèr (3);

La réaction de Thomas-Binetti (4).

L'étude du mécanisme de cette dernière réaction fait l'objet du présent mémoire.

RÉACTION DE THOMAS-BINETTI.

Nous rappelons brièvement le principe et la technique de cette réaction :

(1) C'est d'ailleurs la même opinion qu'exprimait récemment LAVEDAN. *Paris médical*, n° 8, 1925, p. 185.

(2) DOURIS (R.). *Guide pratique pour l'analyse du sang*. Vigot frères, Paris, 1925, p. 192.

(3) FISCHER (R). *Les néoplasmes*, 2, n° 3, 1925, p. 130.

(4) THOMAS et BINETTI. *C. R. Soc. Biol.*, 1, 1922, p. 29.

PRINCIPE. — Thomas et Binetti admettent un pouvoir réducteur aux sérums normaux et cancéreux vis-à-vis du bleu de méthylène en présence d'extrait de tumeurs cancéreuses. Des différences existeraient dans l'intensité du pouvoir réducteur de ces sérums; les sérums cancéreux seraient ceux qui décoloreraient le bleu de méthylène le plus rapidement possible. D'où possibilité de diagnostic en comparant le temps mis par un sérum cancéreux pour obtenir la décoloration du bleu de méthylène avec celui mis par un sérum normal dans les mêmes conditions.

RÉACTIFS NÉCESSAIRES. — La réaction nécessite :

1° Un extrait néoplasique (1);

2° Un sérum normal;

3° Solution neutre du bleu de méthylène de formule :

Bleu de méthylène	1 gramme.
Glycérine	1 cent. cube.
Eau distillée	300 cent. cubes.

TECHNIQUE. — Huit petits tubes sont nécessaires. Dans les tubes numérotés de 1 à 4, on met des doses croissantes de sérum normal et des doses décroissantes d'extrait néoplasique.

NUMÉRO DU TUBE	SÉRUM NORMAL en gouttes	EXTRAIT néoplasique en gouttes	BLEU de méthylène en gouttes
1	5	20	1
2	10	15	1
3	15	10	1
4	20	5	1

Dans les tubes numérotés de 1' à 4', on remplace le sérum normal par le sérum cancéreux à examiner bien privé d'hématies. La proportion des autres réactifs restant la même que dans les tubes de la première série de 1 à 4.

(1) THOMAS et BINETTI donnent d'une façon très sommaire la préparation de leur extrait néoplasique, sans mentionner les rapports entre les différents réactifs employés. Aussi pour ne pas conclure d'après des réactifs préparés par nous, nous avons travaillé avec les produits que l'on rencontre dans les trousse destinées à cette réaction.

On note l'heure exacte de la mise en marche de la réaction pour chaque tube et l'heure exacte de la vérification du phénomène de réduction.

La réaction sera considérée comme positive lorsque la réduction du sérum à examiner sera obtenue dans un temps moindre que celui nécessaire à la réduction du sérum normal. La différence des temps doit être au moins dans le rapport de 5 à 3.

RÉDUCTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE. — Les auteurs considèrent le sérum cancéreux doué d'un pouvoir réducteur particulier mis en évidence par la décoloration du bleu de méthylène. Nous étions curieux de savoir à quelle substance était due cette réduction attribuée par un des auteurs (1) aux lipoides et aux globulines.

Y a-t-il dans le sérum cancéreux une substance particulière n'existant pas dans le sérum normal ou bien la différence entre les deux sérums est-elle due à la présence dans le sérum cancéreux d'un excès d'un constituant normal ?

Nous avons donc cherché parmi les substances de l'organisme celles qui seraient susceptibles de réduire ou d'accélérer la réduction du bleu de méthylène. Nous avons pu constater que le bleu de méthylène, dont la décoloration est facile par le moyen classique à la poudre de zinc, est au contraire très stable vis-à-vis du glucose (tableau nos I, II, III, V, VI, VII), de la bile, substances naturellement réductrices, ainsi que vis-à-vis de beaucoup d'autres substances, telles que urée, cholestérine, lécithine, séro-albumine, séro-globuline, sérum frais, liquide d'ascite, etc... La réduction constatée dans quelques cas a toujours été insignifiante et nullement comparable à celle qui se produit dans la réaction qui nous occupe.

RÉDUCTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE PAR LES SÉRUMS TROUBLES. — Au cours de plusieurs réactions faites dans le but de vérifier le mécanisme de cette technique, nous avons pu constater que les sérums troubles décoloraient plus ou moins dans le temps indiqué pour conclure (trente minutes à deux heures). Cette

(1) THOMAS. *Vie médicale*, n° 17, 1925, p. 856.

décoloration s'effectuait même en l'absence d'antigène. C'est cette observation qui devait nous mettre sur la voie du mécanisme intime de la réaction.

TABLEAU I.

NUMÉRO des tubes	NOM du malade	ÂGE du sérum	SÉRUM	RÉACTIF glucose 1/10	H ² O	BLEU de méthylène	TEMPS de la décoloration	OBSERVATIONS
I	M ^{me} Fl.	24 h.	5	2	20	1	2 h.	Sérum peu trouble.
II	»	»	0	20	7	1	Pas de coloration.	Glucose seul, pas de décoloration.
III	M ^{me} B.	10 h.	5	2	20	1	Pas de coloration.	Sérum frais, clair, normal.
IV	M ^{me} Gu.	9 j.	10	0	17	1	30'	Sérum cancéreux, très trouble.
V	»	»	10	3	14	1	30'	Même sérum avec glu- cose, même résultat.
VI	M ^{me} Go.	3 j.	15	4	10	1	Pas de coloration.	Sérum cancéreux, très peu trouble.
VII	»	6 j.	15	4	10	1	24 h.	Même sérum plus âgé.
VIII	»	»	15	0	12	1	24 h.	Même sérum avec glu- cose, même résultat.
IX	»	8 j.	15	0	12	1	30'	Sérum âgé, trouble.
X	M ^{me} B.	6 j.	15	0	12	1	45'	Sérum normal âgé, trouble.
XI	»	8 j.	15	0	12	1	30'	Même sérum, plus âgé.
XII	M ^{me} L.	8 j.	15	0	12	1	30'	Sérum normal âgé, trouble.

Les chiffres indiquent des gouttes.

Les sérums troubles en question étaient des sérums âgés, conservés au laboratoire sans précautions aseptiques. La décoloration était d'autant plus rapide que le sérum était plus âgé. (Tableau n° 1). Nous avons supposé que le trouble était dû à des colonies microbiennes. Nous avons fait alors l'examen bactério-

logique qui nous a indiqué la présence de bacilles de la putréfaction.

Il y avait donc lieu de supposer l'intervention microbienne dans le phénomène de décoloration du bleu de méthylène qui se produit dans les tubes de la réaction de Thomas-Binetti contenant de l'extrait néoplasique et des sérums non contaminés.

ETUDE BACTÉRIOLOGIQUE DE L'EXTRAIT NÉOPLASIQUE. — L'extrait néoplasique de Thomas-Binetti se présente sous l'aspect d'un liquide jaunâtre, légèrement trouble, d'une odeur nettement putride. A l'examen microscopique, on trouve des bacilles et des spores. L'ensemencement dans l'eau peptonée donne après trois jours un trouble général et un voile assez épais.

L'examen microscopique de la culture montre des bacilles d'une longueur de 4-6 μ et d'une largeur de 0,5 à 1 μ accompagnés de spores. Ces microbes restent colorés par la méthode de Gram. On voit des formations en Y et des filaments pseudo-cladothriciens. Nous ne nous sommes pas préoccupés de déterminer rigoureusement les espèces microbiennes en question au moyen de leurs caractères biologiques. L'intérêt pour nous était seulement d'établir la présence des microbes.

L'extrait néoplasique de Thomas-Binetti est donc un produit septique contenant des microbes virulents. Comment expliquer la présence de ces éléments dans une préparation soumise à la tyndallisation?

Nous avons pu constater que la culture de ces microbes isolés de l'extrait néoplasique, chauffée à quatre reprises à 50-60°, pendant une heure, n'était pas stérilisée et qu'à la température de 100° les spores n'étaient pas détruites.

Dans les conditions indiquées par Thomas-Binetti pour la préparation de leur extrait néoplasique, on n'aboutit pas à un produit aseptique, ce que nous avons pu vérifier sur l'extrait fabriqué par les auteurs.

RÔLE DES MICROBES ISOLÉS DE L'EXTRAIT NÉOPLASIQUE DANS LA DÉCOLORATION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE. — Nous avons donc été amenés à examiner la substitution de la culture à l'extrait néoplasique dans la technique de la réaction.

Les cultures employées étaient faites dans les milieux suivants : eau peptonée, bouillon ordinaire, bouillon-lactose-carbonate, bouillon-ascite, liquide d'ascite. Les colonies anaérobies se présentent dès la sixième heure. En présence de l'air, il se produit un voile plus ou moins épais.

Les cultures qui nous ont donné les meilleurs résultats sont celles obtenues à l'abri de l'air dans des ampoules scellées.

Par exemple, une culture dans le liquide d'ascite, qui nous semblait le milieu le plus favorable, âgée de huit jours, décolorait le bleu de méthylène, en présence du sérum, en dix minutes au plus.

Nous sommes ainsi arrivés à reproduire le phénomène de décoloration du bleu de méthylène dans les conditions de la réaction Thomas-Binetti, alors que les essais avec un grand nombre de produits chimiques réducteurs n'avaient pu nous donner le même phénomène.

Le pouvoir réducteur microbien de l'extrait néoplasique est indiscutable. Est-il dû au microbe lui-même ou à ses produits de sécrétion? Nos expériences à ce sujet au moyen de cultures filtrées semblent montrer que les produits de sécrétion ont également une part dans le phénomène de réduction. Cependant, la rapidité et l'intensité de la réduction est fonction du nombre des microbes vivants.

RÉDUCTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE PAR LES MICROBES EN GÉNÉRAL.
— Ceci concorde d'ailleurs avec les faits que nous avons trouvés dans la littérature concernant la réduction du bleu de méthylène par les microbes en général.

Tous les auteurs attribuent la propriété de réduire le bleu de méthylène à tous les microbes aérobies ou anaérobies. Les divergences n'existent que s'il s'agit d'attribuer ce pouvoir aux microbes eux-mêmes ou à leurs sécrétions.

Pour Raulin (1), Cahen (2), Spina (3), Smith (4), Klett (5), Massen (6), Cathcart (7), la réduction du bleu de méthylène est

(1) RAULIN. *C. R. Acad. Scienc.*, 1888; 107, p. 445.

(2) CAHEN. *Zeitschr. f. Hyg.*, 1887; 2, p. 386.

(3) SPINA. *Centr. f. Bakt.*, 1887; I. Abt., 2, p. 71.

(4) SMITH. *Centr. f. Bakt.*, 1896; I. Abt., 19, p. 181.

(5) KLETT. *Centr. f. Bakt.*, 1900; I. Abt., 27, p. 393.

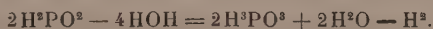
(6) MASSEN. *Arb. an d. k. Gesundheitsamt*, 1902; 18, p. 475.

(7) CATHCART et HAHN. *Arch. f. Hyg.*, 1902; 44, p. 495.

due aux cellules bactériennes. Pour Rozsahegyi (1), Baginsky (2), Müller (3), Wolff (4), la décoloration est due aux sécrétions. Enfin, Carapelle (5), v. Liebermann (6), Gozony et Kramar (7), admettent à la fois l'activité du plasma bactérien et celle des sécrétions microbiennes. Nous avons indiqué plus haut que nos expériences nous rangent avec ces derniers auteurs.

LA RÉDUCTION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE AU POINT DE VUE CHIMIQUE. —

Nous avons vu que la décoloration du bleu de méthylène par les bactéries est due principalement au phénomène de la vie de ces cellules. Nous sommes donc amenés à envisager pour la décoloration du bleu de méthylène, dans le cas qui nous occupe, un processus analogue à celui constaté par Bach (8) dans la décoloration d'une solution aqueuse du bleu de méthylène en présence de boues de platine et d'acide hypophosphorique. La décoloration du bleu de méthylène suit pas à pas l'oxydation de l'acide hypophosphorique :



Quant à l'hydrogène qui figure dans l'équation, il se fixe dans la molécule du bleu de méthylène pour donner la leucobase correspondante, ce qui explique la décoloration.

L'hypothèse qui consiste à considérer la décoloration du bleu de méthylène de la même façon semble logique. En consommant l'oxygène de l'eau, les bactéries libèrent de l'hydrogène qui se fixe immédiatement sur le bleu de méthylène. Il s'agit donc ici d'une oxydation-réduction dont on connaît aujourd'hui de nombreux exemples.

(1) ROZSAHEGYI. *Centr. f. Bakt.*, 1887; 2, p. 448.

(2) BAGINSKY. *Deutsche med. Wochenschr.*, 1888; n° 20, p. 392.

(3) MÜLLER. *Centr. f. Bakt.*, 1899; I. Abt., 26, p. 81.

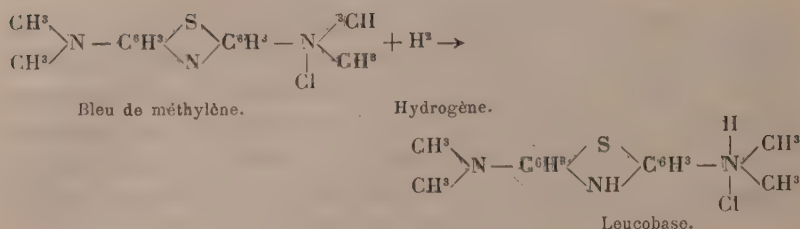
(4) WOLFF. *Centr. f. Bakt.*, 1900; I. Abt., 27, p. 849.

(5) CARAPELLE. *Centr. f. Bakt.*, 1908; I. Abt., 47, p. 545.

(6) V. LIEBERMANN. *Centr. f. Bakt.*, 1909; I. Abt., 51, p. 440.

(7) GOZONY et KRAMAR. *Centr. f. Bakt.*, 1923; I. Abt., 89, p. 193.

(8) BACH, d'après GOZONY et KRAMAR. *Centr. f. Bakt.*, 1923; I. Abt., 89, p. 193.



C'est bien à une réduction qu'est due la décoloration et non pas à une destruction du bleu de méthylène qui pourrait résulter de la consommation du soufre de la molécule colorante par les bactéries. En effet, la décoloration s'effectue dans les tubes de bas en haut, une collerette bleue à la surface a tendance à se former dans les tubes et, en tous cas, l'agitation à l'air des liquides décolorés leur redonne leur couleur primitive par oxydation de la leucobase (1).

RAPIDITÉ DE LA DÉCOLORATION DU BLEU DE MÉTHYLÈNE DANS LA RÉACTION DE THOMAS-BINETTI. — Si nous examinons la rapidité avec laquelle les tubes se décolorent dans la réaction Thomas-Binetti, nous observons que la décoloration commence dans le tube 1 et qu'elle gagne successivement les tubes 2, 3, 4. Si donc un pouvoir réducteur, dans les conditions mêmes de la réaction, devait être attribué au sérum cancéreux, c'est par le tube 4, où la proportion de sérum est maxima, que la décoloration devrait commencer.

Or, les résultats publiés par M. Thomas (2) montrent que souvent la décoloration dans le tube 4 ne se produit pas.

Si nous ajoutons que le sérum cancéreux, frais, en l'absence de l'extrait néoplasique, est incapable de décolorer le bleu de méthylène et que l'extrait de Thomas-Binetti décolore le bleu de méthylène à lui tout seul, nous voyons que ce n'est pas au sérum cancéreux lui-même qu'il faut attribuer un pouvoir réducteur.

(1) Notons en passant que la transformation *in vitro* de l'oxyhémoglobine en hémoglobine est due à une réduction par les formes végétatives de microbes. V. Liebermann a pu constater également, dans ce cas, que les produits de sécrétions de microbes interviennent pour une faible part dans le phénomène, mais que les spores sont sans effet.

(2) Thomas (J.). *La Vie médicale*, 1923, n° 18, p. 908, 909.

CONCLUSIONS.

I. La décoloration du bleu de méthylène dans la réaction de Thomas-Binetti, proposé pour le séro-diagnostic du cancer, est due à une action microbienne. Les microbes nécessaires à la réduction sont apportés par l'extrait néoplasique, lequel, tout de suite après la tyndallisation, ne contient que des spores ayant résisté, mais qui ne tardent pas à végéter dans ce milieu.

II. Contrairement aux affirmations des auteurs, le sérum cancéreux n'a pas de pouvoir réducteur propre sur le bleu de méthylène. La rapidité de la décoloration du bleu de méthylène n'est jamais proportionnelle à la quantité de sérum cancéreux, mais bien au contraire à la quantité de l'extrait néoplasique, c'est-à-dire au nombre des microbes.

III. L'inexactitude de l'hypothèse des auteurs est ainsi démontrée. Si les auteurs ont pu constater dans certains cas des différences entre les sérums normaux et les sérums cancéreux, il faut admettre que, dans ces expériences, les sérums normaux avaient plus d'aptitude à s'opposer à la réduction du bleu de méthylène par les microbes.

Sans vouloir porter un jugement sur la valeur de la réaction, nous pouvons affirmer que l'interprétation donnée est manifestement erronée.

(Travail des laboratoires de l'hôpital Léopold Bellan).

REMARQUES SUR L'EMPLOI DES MILIEUX SYNTHÉTIQUES

par ALBERT BERTHELOT.

Au cours de leurs importantes recherches sur le Bacille de Gessard, E. Aubel, puis Goris et Liot, ont étudié l'action de ce germe sur la tyrosine. Ils ont abouti à des résultats tout à fait opposés, qu'il est d'ailleurs difficile de comparer, puisqu'ils ont été obtenus à l'aide de techniques très différentes. En effet, E. Aubel a constaté un bon développement du Bacille pyocyanique, avec formation de pyocyanine, dans des solutions nutritives chimiquement définies, où la tyrosine était le seul aliment carboné et azoté (1), tandis que Goris et A. Liot ne sont arrivés qu'à un résultat négatif en ensemençant le même germe sur un milieu préparé en solidifiant par la gélose une solution minérale, milieu qu'ils additionnaient, après stérilisation, d'une très minime quantité de tyrosine stérilisée à part (2).

Ayant eu le plaisir de m'entretenir de ces faits avec E. Aubel, j'ai entrepris de les examiner de plus près en tenant compte de ce que j'avais observé, depuis 1910, au cours de mes diverses recherches sur les milieux synthétiques à base d'acides aminés. Je pensais, en effet, que la divergence des résultats que j'essayais de m'expliquer était peut-être due à l'emploi de tyrosines d'origines différentes. Cela me semblait d'autant plus probable que j'avais eu entre les mains, en 1913, une tyrosine fort belle, d'une pureté satisfaisante *au point de vue chimique* puisqu'elle ne renfermait que 3 p. 1.000 de substances étrangères, et avec laquelle cependant je ne pouvais réussir à cultiver le Bacille aminophile. En cherchant les raisons de cette action empêchante, j'avais constaté qu'elle résul-

(1) E. AUBEL, Recherches biochimiques sur la nutrition du Bacille pyocyanique. *Thèse Doctorat Sciences*, Paris, 1921, p. 15.

(2) GORIS et LIOT. *C. R. Acad. des Sc.*, 1921, **172**, p. 1622; 1922, **174**, p. 575; 1923, **176**, p. 491. — LIOT, Culture du Bacille pyocyanique. *Thèse Doctorat Pharmacie*, Paris, 1922, p. 44.

tait simplement de la présence de Ba, à l'état de traces qu'il m'a suffi d'éliminer pour restituer à la tyrosine la propriété d'être assimilée et transformée par le germe acidaminolytique (1).

Cette tyrosine, inutilisable en bactériologie, accusait pourtant à l'analyse le même titre que l'échantillon dont je me servais pour mes recherches ; seulement, dans ce dernier, ce n'étaient pas des traces de Ba qui souillaient l'acide aminé, mais bien des traces de Ca absolument inoffensives pour la bactérie que je désirais cultiver. Si les circonstances ne m'avaient pas amené à contrôler ce produit commercial avec un germe dont les propriétés biochimiques m'étaient bien connues et si, au contraire, je l'avais utilisé d'emblée pour déterminer les propriétés d'une bactérie non étudiée, au point de vue de son action sur la tyrosine, j'aurais pu, de très bonne foi, conclure que cet acide aminé n'était pas attaqué par le microbe essayé. Par conséquent, il était bien naturel d'admettre qu'une telle éventualité pouvait s'être présentée dans des recherches de même nature ayant donné un résultat négatif.

Je me préparais donc à répéter avec une seule tyrosine les essais de A. Aubel, et de Goris et Liot, quand des recherches que je venais de terminer sur un autre sujet m'engagèrent à entreprendre une expérience qui me démontra, qu'avec un même échantillon d'acide aminé et en n'employant que les seuls milieux liquides, le fait de stériliser ensemble ou séparément les constituants de la solution nutritive ou d'effectuer le chauffage séparé de la tyrosine dans des récipients en verres attaquables ou non, conduisait à des résultats absolument discordants et tels que j'ai jugé inutile de commencer les recherches que j'avais projetées. Voici maintenant les conditions de l'expérience à laquelle je viens de faire allusion.

L'eau distillée et les sels que j'ai utilisés ne renfermaient pas trace de composés ammoniacaux ; le phosphate de potassium était réellement le sel dipotassique et non un produit commercial quelconque. Quant à la tyrosine, je l'avais préparée en partant des résidus de la préparation industrielle des peptones pancréatiques, puis soigneusement purifiée par des traitements

(1) Albert BERTHALET et M^{lle} OSSART, Sur la pureté des tyrosines commerciales. *Bull. Soc. Chimie biologique*, 3, n° 5, juin 1921.

à l'acide acétique, des dissolutions et des précipitations successives, suivie de quatre recristallisations, en évitant soigneusement la présence de Ba, Cu, Hg, Ag et Pb. Elle titrait 99,7 p. 100 et contenait des traces de composés calciques et sodiques; mais, par contre, en opérant sur des prises d'essai de 2 à 4 grammes, il m'avait été impossible de déceler la moindre trace soit d'impuretés organiques sulfurées, soit de composés ammoniacaux.

Avec ces éléments, j'ai tout d'abord préparé la solution suivante, sans m'inquiéter du précipité qui devait fatalement se produire :

Eau distillée.	1.000
PO ⁴ K ⁺ H ⁻	1 gr. 5
SO ⁴ Mg cristallisé	0 gr. 75

Je l'ai répartie par 100 cent. cubes dans sept petits ballons de verre blanc ordinaire; dans l'un d'eux, j'ai ajouté 0 gr. 15 de tyrosine. D'autre part, j'ai mis dans des tubes à essais en verre blanc ordinaire, en verre vert, en « résistance glas », en « Pyrex » et en quartz, de la tyrosine en suspension dans l'eau distillée, à raison de 10 cent. cubes d'eau et de 0 gr. 15 d'acide aminé par tube. J'ai bouché à l'ouate tous les récipients et stérilisé le tout trente minutes à 120°, c'est-à-dire plus longtemps et à plus haute température que dans les conditions habituelles.

Immédiatement après la stérilisation, j'ai introduit aseptiquement, dans cinq des ballons ne contenant que de la solution minérale, la bouillie stérile d'un tube de chacune des sortes de verre. J'ai laissé refroidir tous les ballons; puis, je les ai portés à 37° vingt-quatre heures, afin de contrôler l'asepsie des divers milieux.

J'ai prélevé aseptiquement et conservé dans des tubes en Pyrex stériles quelques centimètres cubes des sept solutions qui présentaient la composition suivante :

- I. Solution minérale.
- II. Solution minérale + tyrosine chauffée dans la solution saline alcaline.
- III. Solution minérale + tyrosine chauffée en tube verre blanc dans l'eau distillée.
- IV. Solution minérale + tyrosine chauffée en tube verre vert dans l'eau distillée.
- V. Solution minérale + tyrosine chauffée en tube « résistance glas » dans l'eau distillée.

VI. Solution minérale + tyrosine chauffée en tube « Pyrex » dans l'eau distillée.

VII. Solution minérale + tyrosine chauffée en tube quartz dans l'eau distillée.

Bien entendu, la tyrosine était partout en grand excès, puisque sa solubilité à froid *dans l'eau distillée* est d'environ 1 pour 2.000 ; il est bon d'ailleurs de ne pas perdre ce détail de vue, quand on prépare des milieux pour l'étude chimique des bactéries, et de se souvenir que les tyrosines plus solubles renferment une proportion notable d'impuretés surtout protidiques.

J'aiensemencé chaque milieu avec une anse d'une suspension aqueuse de Bacille pyocyannique, préparée en délayant dans la solution de NaCl à 9 p. 1.000 des corps microbiens, âgés de vingt-quatre heures, recueillis sur des tubes de gélose dépourvus d'eau de condensation. Tous les ballons ont alors été placés dans l'étuve à 37°.

Très rapidement le milieu chauffé à 120° avec la tyrosine donna une belle culture avec abondante production de pyocyanine et de pigment vert fluorescent. Dans le ballon contenant la solution saline additionnée de tyrosine stérilisée séparément en tube de verre blanc, le Bacille pyocyannique se développa, bien moins vite que dans le premier cas, avec, cependant, apparition précoce de la fluorescence verte, mais formation tardive de pyocyanine.

Avec le milieu additionné de tyrosine chauffée dans un tube de verre vert, le développement bactérien fut moins rapide que dans le cas précédent, mais il y eut encore formation de pigment fluorescent avec lente apparition de pigment bleu. Le ballon auquel avait été ajouté la tyrosine chauffée dans le tube de « résistance glas » a donné des résultats analogues à ceux fournis par le milieu « verre vert », mais la culture était sensiblement moins riche, avec fluorescence verte tardive et moins de pyocyanine qui est apparue encore plus tard.

La solution nutritive obtenue avec la tyrosine chauffée provenant du tube en « Pyrex » n'a donné qu'une culture encore moins abondante avec fluorescence verte tardive, mais sans apparition de pyocyanine, même après deux semaines de séjour à 37°. Enfin, pour le milieu dont la tyrosine avait été stérilisée à 120° en tube de quartz, les résultats ont été les mêmes que dans l'essai avec chauffage en tube de Pyrex : fluorescence,

mais pas de pyocyanine. Naturellement, dans le ballon ne renfermant que la solution minérale il n'y a pas eu développement microbien.

Par conséquent, lorsqu'on chauffe ensemble, à 120° , la tyrosine et les constituants minéraux du milieu, il y a formation d'une substance qui favorise considérablement le développement du Bacille pyocyanique et surtout la formation de pyocyanine. En outre, quand on stérilise, à 120° , dans l'eau distillée, la tyrosine que l'on veut introduire dans la solution minérale chauffée à part, on voit diminuer de plus en plus la proportion de cette substance favorisante, à mesure que l'on emploie, pour effectuer la stérilisation de l'acide aminé, des tubes en verres moins attaquables. Les produits alcalins, que ces verres cèdent à l'eau en proportion plus ou moins grande suivant leur nature, ont donc également une action sur la tyrosine.

En raison des faits mis en évidence par Goris et Liot sur le rôle de l'ammoniaque dans la formation de la pyocyanine, il était logique d'admettre que l'action de la chaleur, des sels et du verre déterminait la formation de traces variables de corps ammoniacaux. J'ai vérifié qu'il en était bien ainsi et j'aurais pu, dans une certaine mesure, prévoir l'évolution des cultures après avoir simplement examiné avec le réactif de Nessler les échantillons des divers milieux prélevés avant l'ensemencement. En effet, à part la solution minérale, tous réagissaient faiblement, mais alors que le milieu du ballon II donnait une réaction assez accusée, avec le ballon III (tyrosine verre blanc) la teinte caractéristique était beaucoup plus faible. Celle-ci était plus atténuée pour le ballon IV (tyrosine verre vert) et encore plus légère avec le ballon V (tyrosine résistance glas). Enfin, pour les prises d'essai des ballons VI et VII (tyrosines Pyrex et quartz), la réaction *était extrêmement* faible, à la limite de la sensibilité du réactif.

D'autre part, pour contrôler à la fois l'influence du chauffage à 120° et la pureté de la tyrosine, j'ai introduit dans un flacon de Pyrex 100 cent. cubes d'eau distillée — vérifiée exempte d'ammoniaque —, puis j'y ai ajouté 1 gr. 50 de tyrosine. J'ai obturé l'ouverture de ce flacon avec un bouchon de liège neuf recouvert de papier d'étain et je l'ai soumis pendant une heure à une forte agitation à l'aide d'un appareil à secousses. J'ai

centrifugé et examiné le liquide clair; malgré l'emploi d'une proportion de tyrosine dix fois plus forte que dans mes milieux, je n'ai pu déceler trace de composés ammoniacaux.

Dans les intéressantes recherches de E. Aubel et de Goris et Liot, la divergence des résultats ne provient donc pas seulement de différences dans la nature et l'état des milieux, mais aussi de l'intervention d'autres facteurs. Ces derniers ont du reste influencé diversement les deux groupes d'essais puisque ceux-ci ont été effectués avec des techniques dissemblables, dans des conditions de stérilisation différentes et fort probablement avec des récipients de verres qui n'avaient pas la même composition.

L'influence des deux causes d'erreur que je viens d'indiquer étant suffisante pour modifier les résultats obtenus avec une même tyrosine, il était inutile de chercher davantage à expliquer l'opposition de faits établis par deux séries d'expériences ayant vraisemblablement porté sur deux échantillons différents de tyrosine. Aussi ai-je arrêté là mes essais qui ne portaient en somme que sur un point dont l'intérêt apparaît bien secondaire à côté de l'importance des multiples données que les travaux de E. Aubel, de Goris et Liot et ceux plus récents de Supniewski (1) nous ont apportées sur les propriétés biochimiques du Bacille de Gessard.

Certes, les faits que je viens de signaler ne valent que pour les conditions dans lesquelles je me suis placé, les produits, les verres et la race de Bacille pyocyanique que j'ai employés, mais cependant il m'a semblé utile de les exposer en détail et de les commenter, ne serait-ce que pour donner aux débutants un nouvel exemple des modifications que de minimes influences physiques ou chimiques peuvent apporter aux propriétés des milieux chimiquement définis et montrer une fois de plus quelles minutieuses précautions sont indispensables quand on veut étudier, à l'aide de ces mêmes milieux synthétiques, certaines propriétés biochimiques de bactéries.

En 1913, j'ai déjà recommandé de toujours stériliser à part les glucides que l'on désire incorporer à une solution nutritive pour examiner le pouvoir saccharolytique des microbes; depuis, je me suis rendu compte que cette précaution était

(1) J. SUPNIEWSKI. *Biochemische Zeitschrift*, 146, 1924, p. 522; 154, p. 90 et 98.

nécessaire avec nombre d'amino-acides, d'amines, d'amides et de sels alcalins ou alcalino terreux de certains acides organiques, mais si je stérilisais par filtration sur bougie mes solutions concentrées d'arginine par exemple, je n'hésitais pas à introduire directement dans les milieux, que je stérilisais à 115°, des acides aminés tels que la tyrosine. J'avoue que jusqu'ici je ne croyais pas la tyrosine *pure* si sensible à l'action combinée de la chaleur et d'une très faible alcalinité ($pH = 8,5$).

Pendant longtemps, quand on avait purifié à fond tous les éléments qui devaient être introduits dans une solution nutritive, quand on avait soigneusement ajusté la réaction de celle-ci et que, par filtration ou par chauffage modéré, on avait stérilisé séparément les constituants réputés les plus fragiles de cette même solution, on croyait s'être mis à l'abri de toutes les causes possibles d'erreur. Nous venons de voir que l'on se trompait et qu'il est important, si l'on ne veut pas rendre inutiles toutes les précautions prises, de choisir convenablement le verre des récipients dans lesquels on veut stériliser par la chaleur un milieu synthétique ou certains de ses éléments séparés. J'ai pris pour mon expérience les verres que j'avais sous la main, mais on trouve dans le commerce bien des marques de verres très siliceux, très résistants au point de vue chimique, parmi lesquels on pourra fixer son choix par quelques essais préalables, sans négliger les considérations de prix qui ont maintenant tant d'importance.

On admettait généralement que l'utilisation des milieux synthétiques ne présentait guère de difficultés, mais les progrès de la physico-chimie, de la chimie biologique et de la physiologie des bactéries en ont fait apparaître. On ne saurait trop les rechercher et les faire connaître. Si, dans de nombreux cas, il n'y a pas lieu de s'inquiéter des causes d'erreur sur lesquelles je viens d'insister, dans beaucoup d'autres on devra absolument les éviter, en particulier quand on voudra préciser certaines propriétés d'une espèce microbienne.

En terminant cette note je tiens à rendre un hommage reconnaissant à la mémoire de C. Gessard qui, depuis 1904, m'a si souvent guidé de ses bienveillants conseils. C'est à l'obligeance de ce regretté savant que je dois la souche de *Bacille pyocyanique* avec laquelle j'ai effectué mes essais.

**NOTE SUR LES CARACTÈRES D'UN MICRO-ORGANISME,
APPARTENANT AU GROUPE DES *SALMONELLÆ*,
PROVENANT DE RATS ET DE COBAYES
ATTEINTS D'UNE MALADIE ÉPIZOOTIQUE**

par I. GHEORGIU.

(*Laboratoire de bactériologie. Lister Institute, Londres.*)

Dans une note antérieure (1) j'ai décrit quelques caractères d'un microbe isolé des rats et des cobayes morts pendant une épizootie qui sévissait parmi les petits animaux du Laboratoire de Bactériologie et d'Hygiène à Strabourg en 1924. A cause de certaines difficultés rencontrées au cours de mes premières recherches, je n'ai pas pu déterminer avec exactitude les réactions sérologiques de ce bacille. Cependant, ces réactions biochimiques m'ont conduit à la conclusion que ce microbe n'avait aucun rapport avec les *Salmonellæ*. Or, à la lumière d'une étude approfondie de ce micro-organisme poursuivie dernièrement au Lister Institute, à Londres, cette conclusion se trouve infirmée.

RÉACTIONS SÉROLOGIQUES.

Pour les réactions agglutinantes, je me suis servi, ou bien des cultures sur gélose âgées de douze heures, ou bien des cultures en bouillon de dix-huit heures. Les anti-sérums nécessaires et les cultures types du groupe *Salmonellæ* ont été mis à ma disposition par M. Bruce White, que je tiens à remercier particulièrement de sa grande obligeance.

Pour compléter cette étude, j'ai préparé avec un lapin et un cobaye deux sérums contre le bacille « X ». Tous deux ont atteint le titre de 9.000 pour le bacille homologue. Le tableau n° III résume les réactions d'agglutination obtenues avec ce

(1) Ces *Annales*, 39, p. 712.

sérum anti « X » et les cultures types du groupe *Salmonellæ*, avant et après absorption pour les souches dont il s'agit.

TABLEAU I. — Réactions d'agglutination
avec les anti-sérums types et le bacille « X ».

ANTI-SÉRUM	SOUCHE employée pour la production d'anti-sérum	TITRE homologue	TITRE POUR LE BACILLE « X »	
			Gélose	Bouillon
<i>Enteritidis</i> . . .	« Brighton ».	1 : 20.000	1 : 300	1 : 20.000
<i>Enteritidis</i> . . .	« Ratin ».	1 : 50.000	1 : 600	1 : 20.000
<i>Derby</i>	« Derby pie ».	1 : 40.000	1 : 1.000	1 : 20.000
<i>Typhosus</i>	« Todd ».	1 : 20.000	1 : 1.000	1 : 1.000
<i>Paru. B</i>	« Hadfield ».	1 : 50.000	1 : 500	1 : 500
<i>Aertrycke</i>	« Glasgow ».	1 : 20.000	1 : 400	1 : 400
<i>Newport</i>	« Shrewsbury ».	1 : 10.000	—	1 : 100
<i>Reading</i>	« Nicholls ».	1 : 10.000	—	1 : 100
<i>Abortus equi</i> . .	« Avortement cheval ».	1 : 40.000	—	1 : 100
<i>Suipestifer</i> . . .	« Plymouth ».	1 : 20.000	—	1 : 100

TABLEAU II. — Titre des anti-sérums
pour les micro-organismes après absorption avec le bacille « X ».

SOUCHE	TITRE
<i>Enteritidis</i> « Brighton »	< 200
<i>Enteritidis</i> « Ratin »	200 (Tr.)
<i>Derby</i> « Derby pie »	> 20.000
<i>Typhosus</i> « Todd »	20.000
<i>Aertrycke</i> « Glasgow »	20.000

TABLEAU III. — Action du sérum anti « X » sur le bacille « X »
à une dilution au centième, après avoir été absorbé par :

SOUCHE	TITRE	
<i>Organisme</i> « X »	1 : 9.000	
<i>Enteritidis</i> « Brighton »	1 : 1.000 F	Nil.
<i>Enteritidis</i> « Ratin »	1 : 1.000 F	Trace.
<i>Derby</i> « Derby pie »	1 : 1.000 F	+++
<i>Typhosus</i> « Todd »	1 : 400 f	++
<i>Aertrycke</i> « Glasgow »	1 : 500 f	+++

F, grands floccules; f, petits floccules.

Des faits rapportés ci-dessus, il résulte que le bacille « X » est capable d'absorber toutes les agglutinines présentes dans un sérum anti-*Enteritidis* Gärtner, mais qu'il ne change en rien le titre homologue des sérums préparés contre les autres *Salmonellæ*. Inversement, les souches de *B. Enteritidis* Gärtner épuisent entièrement le sérum anti « X » de ses agglutinines tandis que les autres *Salmonellæ* n'en sont pas capables.

Finalement, j'ai pratiqué la réaction de fixation avec le sérum anti « X » et les résultats obtenus sont parallèles à ceux fournis par les réactions d'agglutination et d'absorption. Voici les résultats (Tableau IV).

ANTIGÈNE	RÉSULTAT
<i>Organisme</i> « X »	— — —
<i>Enteritidis</i> « Brighton »	— — —
<i>Enteritidis</i> « Ratin »	— — —
<i>Typhosus</i> « Todd »	— — +
<i>Derby</i> « Derby pie »	— + +
<i>Aertrycke</i> « Glasgow »	+ + +

+ + +, hémolyse complète, pas de fixation; — — +, fixation partielle; — + +, fixation partielle; — — —, fixation complète.

La conclusion s'impose donc que le microbe — que je croyais d'abord n'avoir aucun rapport avec les *Salmonellæ* — appartient en réalité au groupe *Enteritidis* des *Salmonellæ*.

LES VACCINATIONS ANTIRABIKUES

A L'INSTITUT PASTEUR EN 1925

par JULES VIALA, Préparateur du Service antirabique.

Pendant l'année 1925, 782 personnes ont subi le traitement antirabique à l'Institut Pasteur de Paris : aucune mort n'a été signalée.

La statistique s'établit donc ainsi :

Personnes traitées	782
Mort	0
Mortalité p. 100.	0

Le tableau ci-dessous indique les résultats généraux des vaccinations depuis l'origine :

ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100	ANNÉE	PERSONNES traitées	MORTS	MORTALITÉ p. 100
1886	2.671	25	0,94	1906	772	1	0,13
1887	2.770	14	0,79	1907	786	3	0,38
1888	1.622	9	0,55	1908	524	1	0,19
1889	1.830	7	0,38	1909	467	1	0,21
1890	1.540	5	0,32	1910	401	0	0,00
1891	1.559	4	0,25	1911	341	1	0,29
1892	1.790	4	0,22	1912	395	0	0,00
1893	1.648	6	0,36	1913	330	0	0,00
1894	1.387	7	0,50	1914	373	0	0,00
1895	1.520	5	0,38	1915	654	1	0,15
1896	1.308	4	0,30	1916	1.388	3	0,21
1897	1.529	6	0,39	1917	1.543	4	0,26
1898	1.465	3	0,20	1918	1.803	3	0,16
1899	1.614	4	0,25	1919	1.813	3	0,16
1900	1.420	4	0,28	1920	1.126	6	0,53
1901	1.321	5	0,38	1921	998	1	0,10
1902	1.005	2	0,18	1922	754	0	0,00
1903	628	2	0,32	1923	727	0	0,00
1904	755	3	0,39	1924	764	1	0,14
1905	721	3	0,41	1925	782	0	0,00

Les personnes traitées à l'Institut Pasteur sont divisées en trois catégories.

Catégorie A. — La rage de l'animal mordeur a été expérimentalement constatée par le développement de la maladie chez des animaux mordus par lui ou inoculés avec son bulbe.

Catégorie B. — La rage de l'animal mordeur a été constatée par examen vétérinaire.

Catégorie C. — L'animal mordeur est suspect de rage.

Nous donnons ci-après la répartition entre ces catégories des personnes traitées en 1925 :

ANNÉE 1925	MORSURES à la tête			MORSURES aux mains			MORSURES aux membres			TOTAUX		
	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100	Traités	Morts	Mortalité p. 100
Catégorie A.	14	0	0	53	0	0	43	0	0	110	0	0
Catégorie B.	23	0	0	155	0	0	138	0	0	316	0	0
Catégorie C.	34	0	0	192	0	0	130	0	0	356	0	0
	71	0	0	400	0	0	311	0	0	782	0	0

Les personnes se répartissent de la façon suivante, d'après le territoire sur lequel elles ont été mordues :

France.	757
Allemagne (armée du Rhin).	16
Egypte.	2
Pologne.	2
Roumanie.	2
Santa-Cruz.	3

Répartition par départements des 752 personnes traitées mordues en France.

Aisne.	1	Aveyron.	4
Allier.	2	Aube.	5
Alpes-Maritimes.	2	Calvados.	5
Ardennes.	1	Cantal.	36

Charente	2	Marne (Haute-)	4
Cher	2	Maine-et-Loire	7
Corrèze	17	Meurthe-et-Moselle	4
Côte-d'Or	8	Morbihan	7
Côtes-du-Nord	10	Nièvre	9
Creuse	1	Oise	13
Doubs	3	Orne	6
Drôme	2	Pas-de-Calais	2
Eure	6	Puy-de-Dôme	7
Eure-et-Loir	5	Pyrénées (Orientales)	3
Finistère	13	Rhône	1
Gard	2	Seine	299
Ille-et-Vilaine	24	Seine-et-Marne	7
Indre	3	Seine-et-Oise	108
Indre-et-Loire	6	Seine-Inférieure	22
Lot	19	Sèvres (Deux-)	2
Loir-et-Cher	6	Somme	5
Loire-Inférieure	11	Vendée	5
Loiret	5	Vienne	20
Manche	5	Vosges	3
Marne	5	Yonne	7

Depuis 1912, l'Institut Pasteur a adopté la méthode de conservation en glycérine des moelles atténuées, introduite dans la pratique par A. Calmette.

On se sert de pots-bans d'une contenance de 50 cent. cubes.

Dans chacun, on verse 25 cent. cubes de glycérine à 30° B°, neutre.

On stérilise à 120°, pendant vingt minutes.

On laisse refroidir et on introduit dans chaque pot-ban quelques fragments de moelles préalablement desséchées dans un flacon de potasse, d'après la méthode initiale de Pasteur.

Dans chaque flacon contenant la glycérine on peut mettre plusieurs fragments de moelle dont la longueur totale peut atteindre 5 centimètres.

On conserve ces flacons à la glacière aux environs de + 4°.

Pour éviter l'infection de la moelle chez les lapins paralysés et agonisants, on place ces derniers à même dans la glace.

Sitôt qu'ils sont morts, on extrait la moelle par la méthode d'Oshida, au moyen d'un mandrin métallique nickelé stérile (1).

On n'utilise, pour la vaccination des personnes mordues, que des moelles ayant séjourné *moins de vingt jours* en glycérine,

(1) Ces mandrins (modèle de Jules Viala) sont construits par la fabrique d'instruments de chirurgie Collin, rue de l'École-de-Médecine, à Paris.

l'expérience ayant montré que le degré d'atténuation de chaque moelle n'est pas sensiblement modifié pendant les vingt premiers jours.

*
* *

Nous reproduisons ci-après, parce qu'il nous a été demandé de divers côtés, le schéma des traitements suivis par les mordus, suivant la gravité de leurs morsures.

Injections antirabiques.

1 ^{er} jour	Moelle de 5 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures</i> <i>légères.</i>
2 ^e —	— 5 —	
3 ^e —	— 4 —	
4 ^e —	— 4 —	
5 ^e —	— 3 —	
6 ^e —	— 3 —	
7 ^e —	— 4 —	
8 ^e —	— 3 —	
9 ^e —	— 2 —	
10 ^e —	— 4 —	
11 ^e —	— 3 —	} 3 cent. cubes <i>Morsures multiples.</i>
12 ^e —	— 2 —	
13 ^e —	— 3 —	
14 ^e —	— 3 —	
15 ^e —	— 2 —	
16 ^e jour	Moelle de 4 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures multiples.</i>
17 ^e —	— 3 —	
18 ^e —	— 2 —	
19 ^e jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures graves.</i>
20 ^e —	— 3 —	
21 ^e —	— 2 —	
22 ^e jour	Moelle de 3 jours	} 3 cent. cubes <i>Morsures à la tête.</i>
23 ^e —	— 3 —	
24 ^e —	— 2 —	
25 ^e —	— 2 —	

Le Gérant : G. MASSON.

